

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

La régulation des récepteurs aux interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les kératinocytes humains

Progneaux, Audrey

Award date:
2018

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**La régulation des récepteurs aux interleukines 4 et 13 par les microdomaines
lipidiques dans les kératinocytes humains**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Audrey PROGNEAUX

Janvier 2018

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

La régulation des récepteurs aux interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les kératinocytes humains

PROGNEAUX Audrey

Résumé

La méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) est une molécule amphiphile capable de capturer le cholestérol de la membrane plasmique et, par conséquent, d'y perturber les microdomaines lipidiques. Ces derniers sont connus pour réguler les voies de signalisation de nombreux récepteurs. De plus, des kératinocytes déplétés en cholestérol ont montré un profil d'expression transcriptionnelle similaire à celui de peaux lésionnelles de dermatite atopique (DA). DA est une maladie inflammatoire de la peau correspondant à une réponse immunitaire de type Th2 produisant principalement les interleukines (IL) 4 et 13. Pour étudier ces lésions épidermiques, un modèle de la DA a été créé sur base d'épidermes humains reconstruits (RHE) traités par la M β CD et par les IL-4, -13 et -25. Ce modèle rapporte une réponse additive des deux traitements, suggérant que les récepteurs de ces ILs pourraient se trouver régulés par les microdomaines lipidiques. En outre, une analyse transcriptomique par *microarray* réalisée par notre laboratoire a préalablement révélé une augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-4R α , d'IL-13R α 1 et d'IL-13R α 2 dans les kératinocytes déplétés en cholestérol. IL-4R α et IL-13R α 1 sont les sous-unités des récepteurs aux IL-4 et -13, tandis qu'IL-13R α 2 est un récepteur d'IL-13 considéré comme un récepteur antagoniste. Dans ce mémoire, aucune variation de l'expression d'IL-4R α n'a pu être observée, tandis que cette sous-unité semble migrer vers la membrane plasmique lors d'une déplétion en cholestérol de la membrane. Au contraire, l'expression des transcrits codant IL-13R α 1 et IL-13R α 2 augmente suite à une déplétion membranaire en cholestérol, poursuivie par une stimulation utilisant IL-4, -13 et -25. Néanmoins, la stimulation via l'exposition à IL-4 et -13 semble diminuer l'expression protéique d'IL-13R α 2. Par ailleurs, l'expression d'IL-2R γ , qui est une sous-unité du récepteur de type 1 d'IL-4, semble augmenter lors du traitement par la M β CD et par IL-4 et -13, une observation prometteuse, jamais réalisée avant ce travail. De plus, la voie de signalisation déclenchée par ces récepteurs n'utilisant apparemment pas la voie JAK1/STAT6, ce travail suggère qu'une autre voie est activée par IL-4 et -13.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

Promoteur : Y. Poumay **Co-promoteur :** C. Lambert De Rouvoit

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, Monsieur Yves Poumay, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance tout au long de cette année. Je le remercie également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats lors d'une conférence de la BSCDB. Cela m'a permis de créer un poster et de le présenter en anglais devant des membres de la communauté scientifique et donc de me donner un avant-goût du doctorat. De plus, je le remercie pour le temps qu'il a consacré à la relecture de mon mini-article et de mon mémoire ainsi que pour les nombreux conseils scientifiques qu'il m'a donnés lors de ce travail.

Ensuite, je tiens à remercier, Evelyne De Vuyst, mon encadrante sans qui je ne serais pas là où j'en suis. Je la remercie d'avoir pris son temps à m'apprendre toutes les techniques que je maîtrise maintenant, de m'avoir aidé dans mes réflexions scientifiques et de m'avoir fait également confiance en me laissant gérer mon mémoire. Je la remercie également de l'accueil qu'elle m'a offert et d'avoir pris en compte mes suggestions scientifiques grâce à quoi je me suis sentie comme une collègue et non plus comme une simple étudiante.

Je voudrais également remercier les membres du LabCeTi et du LNR pour leur aide et leur accueil. Merci à Valérie, Kathleen, Céline, Emilie et Joanna pour leurs conseils et leurs réponses à mes questions lorsque j'en avais besoin. Merci à Abdallah de m'avoir aidé en Western Blot et en marquage des microdomaines lipidiques. Merci à Benoit et Daniel pour leur aide pour les marquages histologiques.

Je remercie également Catherine Lambert De Rouvoit pour son aide dans les questions techniques de mon mémoire.

Je tiens aussi à remercier les deux mémorantes qui étaient avec moi cette année dans le laboratoire. Merci à Lindsay, ma compagne de bureau avec qui j'ai bien rigolé et décompressé. Merci aussi à Hanane pour l'entraide tout au long de cette année.

Je voulais également remercier Noëlle Ninane et Catherine Demazy pour avoir pris leur temps à visualiser mes lames au microscope confocal.

Enfin, je voudrais aussi remercier mes amis de Namur et de Wavre et ma famille de m'avoir soutenu pendant toutes ces années et d'avoir cru en moi à des moments où je n'y croyais plus. Sans eux je ne serais jamais arrivée jusqu'ici. Un merci particulier à ma maman, elle saura pourquoi.

Table des matières

Introduction

La peau	1
Général	1
L'hypoderme	1
Le derme	1
L'épiderme	1
La couche basale	2
La couche épineuse	2
La couche granuleuse	2
La couche cornée	2
Les microdomaines lipidiques	3
Général	3
Les fonctions des microdomaines lipidiques	4
La visualisation des microdomaines lipidiques	5
La régulation des voies de signalisation par les microdomaines lipidiques	6
Profil transcriptionnel des kératinocytes déplétés en cholestérol	7
Les récepteurs aux interleukines 4 et 13	8
Type 1	8
Général	8
Le ligand, la dimérisation et l'endocytose	8
La signalisation	9
Type 2	9
Général	9
Les ligands et la dimérisation	10
La signalisation	10
IL-13R α 2	11
Général	11
IL-13R α 2 comme récepteur antagoniste	11
La signalisation	12
Les inhibiteurs des récepteurs aux interleukines 4 et 13	12
Les interleukines	12
La production de ces interleukines	12

La fonction des interleukines 4 et 13	13
La dermatite atopique.....	14
Général	14
Les symptômes.....	14
L'étiologie	15
La génétique	15
L'immunologique.....	16
L'environnement	16
Les traitements	17
Modèle de la dermatite atopique.....	18
Modèles in vivo.....	18
Modèles in vitro	18
Objectif.....	20

Matériel et méthodes

Culture.....	21
Culture primaire des kératinocytes humains	21
Passage des kératinocytes en culture.....	21
Cryopréservation des kératinocytes	22
Culture secondaire des kératinocytes	22
Monocouche de kératinocytes.....	22
Epiderme humain reconstruit (RHE).....	22
Traitement	23
Méthyl- β -cyclodextrine.....	23
Monocouche de kératinocytes.....	23
RHE.....	23
Interleukines	23
Monocouche de kératinocytes.....	23
RHE.....	23
Electroporation	23
Analyse de l'expression relative en ARNm des gènes d'intérêt	24
Principe.....	24
Extraction	24
Monocouche de kératinocytes.....	24
RHE.....	24

Dosage	24
Reverse transcription	24
qPCR	25
SYBRgreen	25
TaqMan	25
Interprétation	25
Analyse de l'expression protéique de protéines d'intérêts	26
Principe	26
Extraction protéique	26
Monocouche de kératinocytes	26
RHE	26
Dosage protéique	26
Electrophorèse et transfert	26
Révélation	27
Marquage immunohistochimique	28
Principe	28
Fixation chimique	28
Tissus	28
Monocouche de kératinocytes	28
RHE	28
Fixation à froid des RHE	28
Coupe au microtome	28
Coupe au cryostat	29
Marquages immunohistochimiques et immunofluorescents	29
Tissus et RHE	29
Monocouche de kératinocytes	30
Co-marquage des microdomaines lipidiques et IL-4R α dans des kératinocytes cultivés en monocouche	30

Résultats

Modèles du mémoire	32
Régulation des sous-unités IL-13R α 1 et IL-4R α lors de la perturbation des microdomaines lipidiques avec le traitement par la M β CD	33
Régulation de l'expression transcriptionnelle et protéique	33
Analyse de la spécificité de l'anticorps anti-IL-4R α par diminution de l'expression génique d'IL-4R α en transfectant les kératinocytes par des siARN	35

Régulation de la localisation d'IL-4R α	36
Régulation de la signalisation	37
Régulation du récepteur IL-13R α 2 lors de la perturbation des microdomaines lipidiques par le traitement par la M β CD.....	38
Régulation de l'expression transcriptionnelle	38
Régulation de l'expression protéique	39
Régulation de la localisation	40
Régulation de la sous-unité IL-2R γ lors d'une condition inflammatoire dans les kératinocytes humains	42
Régulation de l'expression transcriptionnelle	42
Régulation de l'expression protéique	43
Régulation de la localisation	43

Discussion

La régulation des sous-unités IL-4R α et IL-13R α 1 du récepteur de type 2 aux interleukines 4 et 13.....	45
La régulation du récepteur IL-13R α 2.....	48
La régulation de la sous-unité IL-2R γ du récepteur de type 1 aux interleukines 4.....	50
Conclusion et perspective.....	51

Références

Références	53
------------------	----

Abbreviations

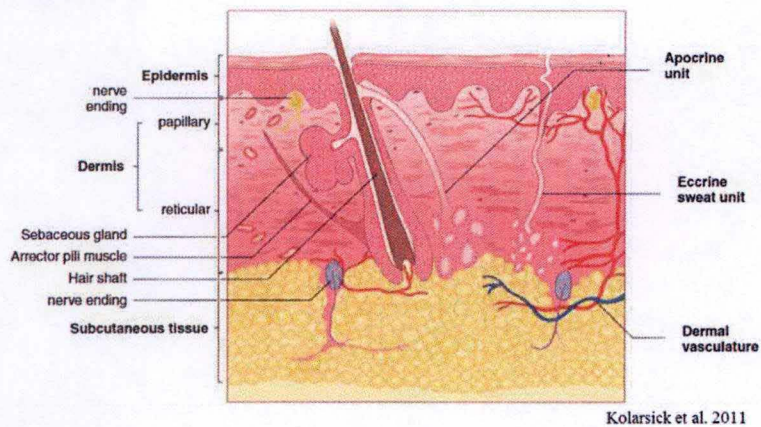
AMP: antimicrobial peptide
AP: activator protein
APS: ammonium persulfate
bodipy-SM: boron-dipyrromethene-sphingomyéline
BPE: bovin pituitary extract
BSA: bovin sérum albumin
CA2: carbonic anhydrase 2
CHI3L1: chitinase-3-like protein 1
CHR: cytokine binding homology region
CT: choléra toxine
CTx: choléra toxine modifiée
DA: dermatite atopique
DAB: diaminobenzidine
DEFB1: β -defensine 1
DETC: dendritic epidermal T cell
dFCS: dialyzed fetal calf serum
DMSO: dimethylsulfoxyde
dNTP: désoxynucléotide triphosphate
DTT: dithiotréitol
EDTA: éthylène diamine tétraacétate
EFA: ethanol-formal-acetic
EGF: epithelial growth factor
EGFR: epithelial growth factor receptor
Egr: early growth response
ERK: extracellular signal-regulated kinases
Fc ϵ RI: high-affinity IgE receptor
FLG: filagrine
FOXP3: forkhead box P3
GPI: glycosylphosphatidylinositol
HB-EGF: heparin binding-EGF like
HKGS: human keratinocyte growth supplement
HRP: horse radish peroxidase
HSE: human skin equivalent
IDCR: ionic detergent compatibility reagent
IFN: interferon
IgE: immunoglobuline E
IGF: insulin-like growth factor
IL: interleukines
IRS: insulin receptor substrate
JAK: janus kinase
KBM: keratinocyte basal medium
KGF: keratinocytes growth factor
KGM: keratinocyte growth medium
LAT: linker of activation of T-cell
MEK: extracellular signal-regulated kinase kinase
MET: microscope électronique en transmission
miARN: micro ARN

MMP: matrix metalloproteinase
M β CD: méthyl- β -cyclodextrine
NELL2: neural EGFL like 2
NGFR: nerve growth factor receptor
NK: natural killer
NMF: natural moisturizing factor
NT: non target
OCT: optimal cutting temperature
PBS: Phosphate Buffered Saline
PDGFR: platelet-derived growth factor receptor
PFA: paraformaldehyde acid
PI3K: phosphatidyl-inositol-3-phosphate
PIP₂: phosphatidylinositol diphosphate
PIP₃: phosphatidylinositol triphosphate
PLAUR: plasminogen urokinase receptor
P-STAT6: phosphorylated STAT6
PTP: protein tyrosine phosphatase
PVDF: polyvinylidene difluoride
RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS: rat sarcoma
RHE: reconstructed human epidermis
RT-qPCR: reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
S. aureus: staphylococcus aureus
SDS: sodium dodecyl sulfate
Smad3: mothers against DPP homolog
SOCS: supressor of cytokines signalling
STAT: signal transducer and activator of transcription
TBS: tris buffer saline
TEMED: Tetramethylethylenediamine
TGF: transforming growth factor
TLR: toll-like receptor
TLSP: thymic stromal lymphopoietin
TNBS: Trinitrobenzenesulfonic acid
TNF- α : tumor necrosis factor α
Treg: lymphocyte T régulateur
TYK: tyrosine kinase
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1
VEGF: vascular endothelial growth factor
VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

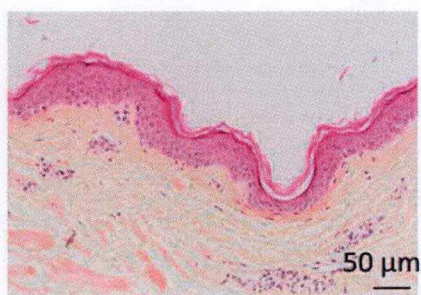
INTRODUCTION

INTRODUCTION

La peau



Kolarsick et al. 2011



L'épiderme

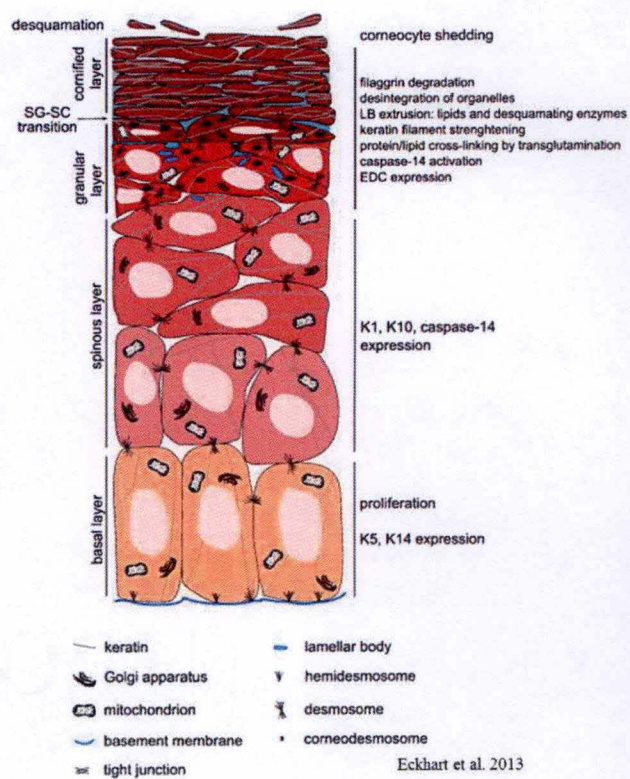


Figure 1: schématisation et coupe histologique de la peau

La peau

Général

La peau, organe du corps la plus externe, joue un rôle dans de nombreux phénomènes physiologiques. Elle forme notamment une barrière physique ou chimique contre l'entrée de micro-organismes ou allergènes et contre la perte de fluide corporel. Elle participe aussi à la thermorégulation, la protection contre les rayons UV, la sensibilité au toucher. Ces fonctions sont assurées par les trois couches de la peau : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Voir figure 1). Malgré des rôles différents, ces couches interagissent cependant entre elles (Baroni *et al.*, 2012; Fore, 2006; Kolarsick *et al.*, 2011).

L'hypoderme

L'hypoderme, la couche la plus interne, est constituée d'adipocytes en lobules appelés septa dans lequel les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les nerfs sont présents. Cette couche participe à l'isolation, l'intégrité mécanique, la réserve d'énergie et la morphologie du corps (Chu, 2012).

Le derme

Le derme, couche se trouvant entre l'hypoderme et l'épiderme, est richement vascularisé et innervé. Il contient des fibres d'élastines et de collagènes produits par les fibroblastes. Ces cellules participent également à la formation de la lame basale où reposent les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Grâce à sa vascularisation, le derme interagit avec l'épiderme en lui donnant les nutriments et l'oxygène nécessaires mais également, lors d'inflammation, en lui fournissant les cellules de l'immunité innée et adaptative. Le derme contient également les appendices de l'épiderme, tels que les glandes sébacées, les glandes sudoripares eccrines, apocrines et apoecrines et les follicules pileux. Toutes ces structures permettent plusieurs rôles au derme, tels que l'élasticité, la protection contre les dommages mécaniques, la thermorégulation ou encore donner une réponse immune (Chu, 2012; Kolarsick *et al.*, 2011; Leung, 2013).

L'épiderme

L'épiderme, couche la plus externe, se trouve en contact avec l'extérieur et donc son rôle premier est la formation d'une barrière. En effet, cette dernière est formée principalement par la couche cornée qui est la plus externe des quatre couches de l'épiderme, les trois autres étant les couches basale, épineuse et granuleuse. Ces différentes couches se distinguent par la différenciation des kératinocytes constituant 80% des cellules de l'épiderme, les 20 autres % étant les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes (Baroni *et al.*, 2012; Kolarsick *et al.*, 2011).

Les kératinocytes produisent de la kératine de type différent en fonction de la couche où ils se trouvent. Les kératines 5 et 14 sont exprimées dans les kératinocytes de la couche basale alors que dans ceux de la couche épineuse ce sont les kératines 1 et 10 qui sont exprimées. La kératine, élément du cytosquelette, joue un rôle dans l'intégrité de la structure cellulaire. De plus, ces cellules jouent un rôle important dans l'inflammation et la formation de barrière (Baroni *et al.*, 2012; Eckhart *et al.*, 2013; Frankart *et al.*, 2012a; Jans *et al.*, 2004; Koch and Roop, 2004).

Les mélanocytes, quant à eux, sont présents que dans la couche basale. Ils jouent un rôle dans la protection de l'organisme contre les rayons UV et sont responsables de la couleur de la peau. Ces cellules étoilées contiennent des mélanosomes qui produisent de la mélanine donnant une couleur brunâtre à la peau (Kolarsick *et al.*, 2011).

Les cellules de Langherans sont des cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T dans le but de les activer. Ces cellules se trouvent majoritairement dans les couches épineuse et granuleuse même si une faible quantité est retrouvée dans la couche basale (Kolarsick *et al.*, 2011).

Enfin, les cellules de Merkel, sont des mécanorécepteurs d'adaptation lente permettant une sensibilité tactile élevée (Kolarsick *et al.*, 2011).

La couche basale

La couche basale contient une assise de kératinocytes de forme cubique, interconnectés entre eux par des desmosomes et à la lame basale par des hémidesmosomes. Les kératinocytes de cette couche ont un grand pouvoir prolifératif grâce à leur interaction avec la β -intégrine. En effet, dans cette couche se trouvent des cellules souches et progénitrices se différenciant en kératinocytes respectivement au niveau des papilles dermiques et du rete ridges (Gniadecki and Bang, 2003; Koch and Roop, 2004; Kolarsick *et al.*, 2011).

La couche épineuse

La couche épineuse, appelée ainsi par la présence de desmosomes et de jonctions GAP, contient 5 à 10 couches de kératinocytes qui commencent à se différencier par le détachement des cellules de la lame basale. Au fur et à mesure qu'on avance dans les couches, elles deviennent de plus en plus aplaties et commencent à produire les corps lamellaires qui synthétisent les lipides importants pour la couche cornée (Baroni *et al.*, 2012; Eckhart *et al.*, 2013; Kolarsick *et al.*, 2011).

La couche granuleuse

Dans la couche granuleuse, les kératinocytes synthétisent les granules de kératohyalines contenant les protéines importantes pour la cornification telles que l'involucrine, la loricrine, la profilaggrine ainsi que des enzymes protéolytiques. La profilaggrine, précurseur de la filaggrine (FLG) sera clivée par la caspase 14 dans la couche granuleuse, la rendant donc fonctionnelle. De plus, la concentration en calcium augmente dans cette couche pour permettre l'exocytose, au niveau de la zone extracellulaire de la couche cornée, de lipides modifiés par des enzymes dans les corps lamellaires. De plus, cette couche participe à la barrière grâce à la formation de jonctions serrées (Baroni *et al.*, 2012; De Benedetto *et al.*, 2009; Eckhart *et al.*, 2013; Kolarsick *et al.*, 2011).

La couche cornée

La couche cornée peut être vue comme un modèle de briques-mortier formant la barrière épidermique. Effectivement, les cornéocytes et les lipides modifiés dans les corps lamellaires représentent respectivement les briques et le mortier. De plus, les cornéocytes sont liés entre eux par des jonctions serrées mais aussi par des cornéodesmosomes. Tout ceci donne une structure compacte à cette couche, lui permettant de servir de barrière mécanique (De Benedetto *et al.*, 2009).

Les cornéocytes sont des kératinocytes qui ont subi la cornification. Premièrement, les kératinocytes subissent une mort cellulaire détruisant noyaux et organites qui sont remplacés par un cytosquelette compact. En même temps, une enveloppe cornée apparaît pour protéger les kératinocytes contre des stress mécaniques. Ceci est réalisé par l'attachement de protéines telles que la loricrine et l'involucrine entre elles et à la membrane plasmique au niveau intracellulaire. La transglutaminase, activée par le calcium, permet cet attachement en formant des liens iso-peptidiques entre la glutamine et la lysine. Cette enzyme forme également des liens entre la glutamine et les résidus hydroxy pour rattacher les lipides tels que le cholestérol à la membrane plasmique au niveau extracellulaire. La sulfhydryle oxydase joue également ce rôle en formant des ponts disulfures entre les protéines. Deux hypothèses sont alors avancées sur la formation de cette enveloppe. La première est l'hypothèse « poubelle » dans laquelle les différentes protéines formant l'enveloppe se placent de manière aléatoire. La deuxième hypothèse suggère que l'involucrine se place en premier sur la membrane plasmique et sert d'ancrage pour les autres protéines (Eckhart *et al.*, 2013; Ishida-Yamamoto and Iizuka, 1998; Kolarsick *et al.*, 2011; Mathay *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 1991).

La filaggrine induit l'agrégation de la kératine, élément majeur des cornéocytes, donnant une protection contre le stress mécanique. Elle joue également un rôle dans l'hydratation de la peau du fait de son clivage par la caspase 14 en petits acides aminés servant de facteurs naturels d'hydratation (NMF : natural moisturizing factor), capables de retenir l'eau (Eckhart *et al.*, 2013; Kolarsick *et al.*, 2011).

De plus, la couche cornée sert de barrière chimique par une augmentation de l'acidité et de barrière biologique par la présence de microbiote qui va altérer la survie des micro-organismes, phénomène également réalisé par les AMP (antimicrobial peptide) (Baroni *et al.*, 2012; De Benedetto *et al.*, 2009).

La dernière étape de la kératinisation est la desquamation dont le processus est actif. En effet, au début de la couche cornée, le rapport de l'activité entre les protéases et les antiprotéases, sécrétées par les corps lamellaires, est favorable pour les antiprotéases mais plus on monte dans la couche et plus la favorabilité s'inverse dû à l'augmentation de l'acidité. Les protéases vont dégrader les cornéodesmosomes pour détacher les cornéocytes de l'épiderme. La prolifération, la différenciation des kératinocytes et la desquamation dure en moyenne 28 jours (De Benedetto *et al.*, 2009; De Vuyst *et al.*, 2017; Deraison *et al.*, 2007; Kolarsick *et al.*, 2011; Milstone, 2004).

Les microdomaines lipidiques

Général

Au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes, et plus largement des cellules eucaryotes, il existe des domaines particuliers, à savoir les microdomaines lipidiques. Cette structure complète le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson décrit en 1972 par le déplacement latéral dans la membrane des microdomaines et des protéines associées (Simons and Ehehalt, 2002; Simons and Toomre, 2000).

Le modèle de la mosaïque fluide consiste à décrire la structure de la membrane plasmique en une structure dynamique constituée de lipides, de protéines et d'oligosaccharides. La base de la membrane est formée par une bicouche de phospholipides, lipides amphiphiles, entrecoupée de protéines intégrales, également amphiphiles. Les lipides et les protéines

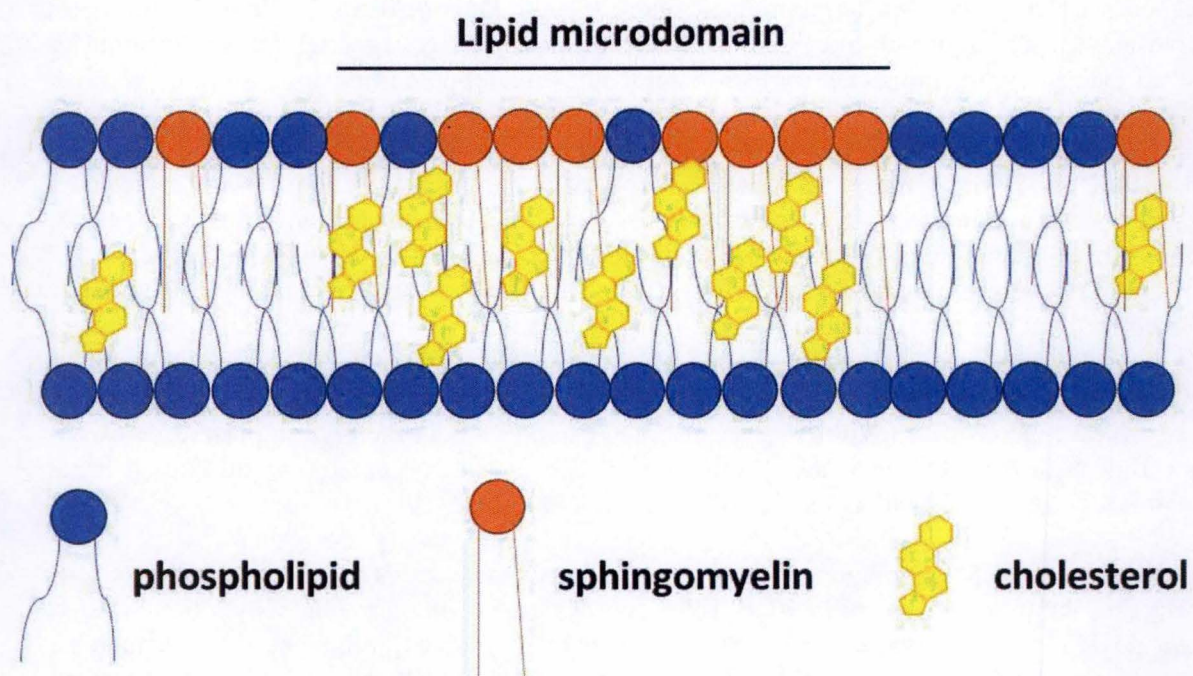


Figure 2: schématisation de la membrane plasmique avec les microdomaines lipidiques

peuvent être modifiés par la liaison de glucides formant respectivement des glycolipides et glycoprotéines (Nicolson, 2014; Singer and Nicolson, 1972).

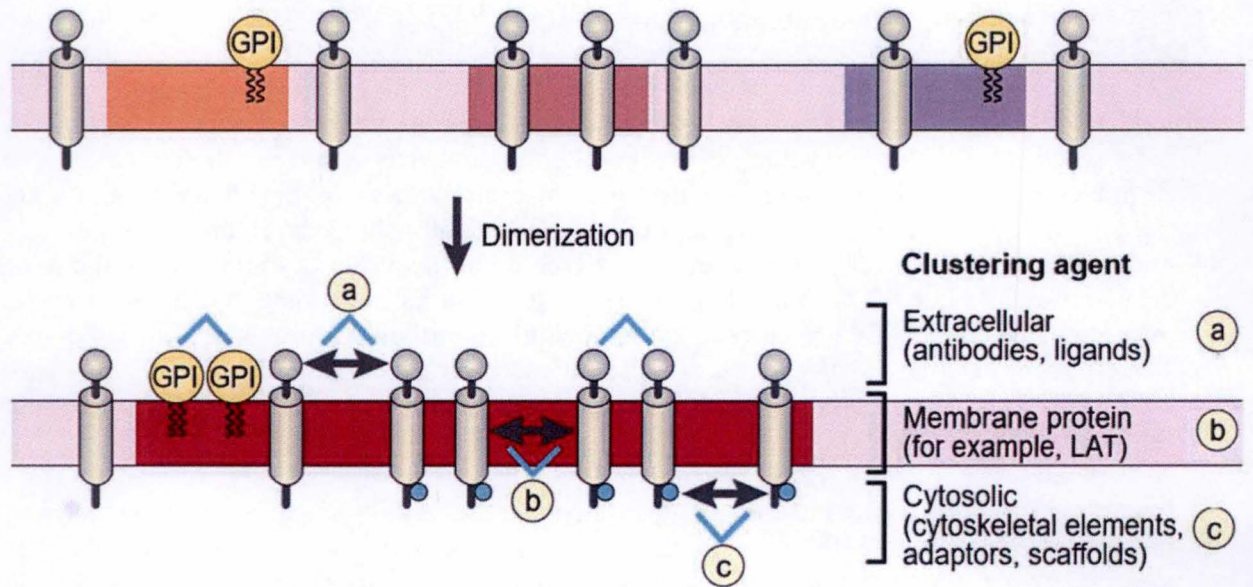
Les éléments supplémentaires contenus dans la membrane plasmique et non décrits par le modèle de Singer et Nicolson sont les microdomaines lipidiques. Ces domaines, constitués principalement de sphingomyélines et de cholestérols, se situent au niveau du feuillet externe de la bicouche. Ce sont des fragments détergent-résistant de la membrane très dynamiques et ont une taille de 10 à 300 nm contenant en moyenne 3000 sphingomyélines. Le nombre de microdomaines se trouvant dans le feuillet externe de la bicouche s'estime à un million par cellules. Sachant que 40 millions de protéines se trouvent en membrane plasmique et qu'un microdomaine contient 20 protéines, il est estimé que 20 millions de protéines sont dispersées aléatoirement dans ces domaines c'est-à-dire 50% des protéines de membrane (Bang *et al.*, 2005; Gniadecki and Bang, 2003; Kabouridis *et al.*, 2000; Rajendran and Simons, 2005; Simons and Ehehalt, 2002).

Les microdomaines sont constitués de deux éléments, les sphingomyélines et le cholestérol induisant des phases de fluide ordonné entre des phases de fluide désordonné dans la membrane plasmique au niveau du feuillet externe (Voir figure 2). En effet, la sphingomyéline est un lipide constitué de longues chaînes d'acides gras saturés contrairement aux phospholipides dont les acides gras sont insaturés formant des coudes et donc une structure désordonnée. Ces longues chaînes d'acides gras permettraient également de donner la structure de fluide ordonné au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Quant au cholestérol, se trouvant dans toute la membrane mais principalement au niveau des microdomaines lipidiques dû à une haute affinité avec les sphingomyélines, va jouer deux rôles. Premièrement il sert de glue pour bien fixer la structure du microdomaine mais donne également le côté dynamique des microdomaines en permettant leur mouvement latéral le long de la membrane pour induire des regroupements de microdomaines et former ainsi des clusters (Gniadecki and Bang, 2003; Rajendran and Simons, 2005; Shaw, 2006; Simons and Ehehalt, 2002; Simons and Sampaio, 2011; Simons and Toomre, 2000).

Il existe également des cavéoles qui ressemblent aux microdomaines lipidiques avec formation d'invaginations dans la membrane recouverte d'un manteau de cavéolines. Leurs fonctions sur les protéines sont dès lors différentes de celles des microdomaines. De plus, certains auteurs rapportent que les cavéoles servent de stockage pour les microdomaines. (Nabi and Le, 2003; Pike, 2005; Simons and Ehehalt, 2002).

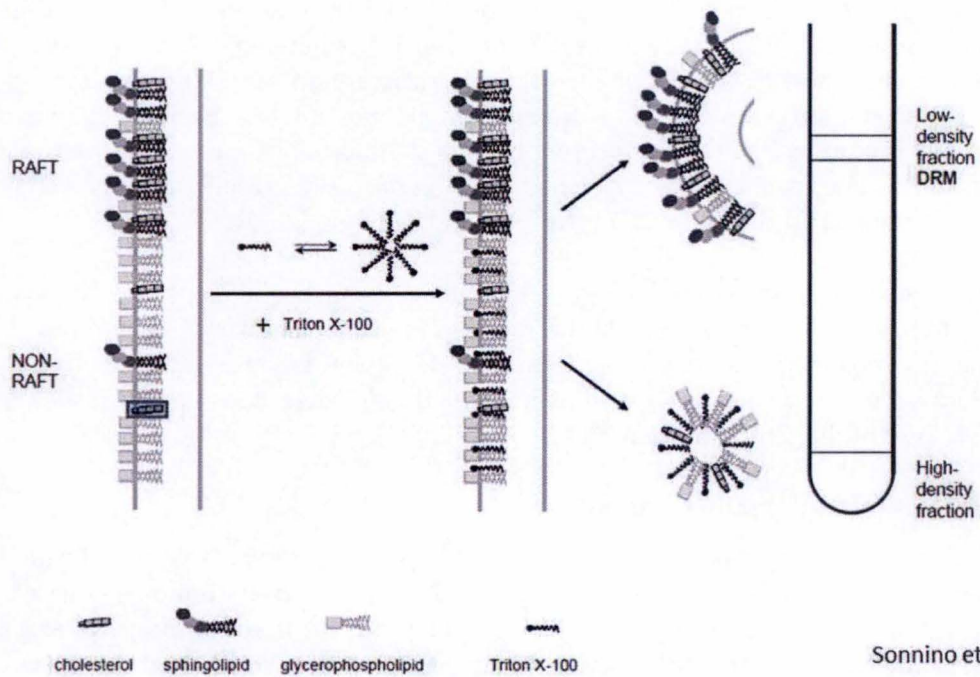
Les fonctions des microdomaines lipidiques

Les microdomaines servent de plateforme physique pour réguler les voies de signalisation des récepteurs de surface. En effet certaines protéines ont des affinités plus ou moins grandes pour ces domaines. Certains auteurs suggèrent que cela peut être dû à la composition en acides aminés des domaines transmembranaires. D'autre proposent que la migration vers ces domaines se réalise via un signal au niveau du domaine cytoplasmique qui ensuite se lie à une protéine ou un lipide des microdomaines. Les principales protéines se trouvant dans ces domaines sont les protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) et les kinases de la famille des SRC. De plus, il a été rapporté que les kératinocytes engagés dans la prolifération ont une plus grande concentration en microdomaines lipidiques au niveau de leurs membranes que les cellules quiescentes (Gniadecki and Bang, 2003; Kabouridis *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2007; Pike, 2005; Shaw, 2006; Simons and Ehehalt, 2002; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000).



Simon et al. 2000

Figure 3: modèle de la formation de clusters de microdomaines lipidiques



Sonnino et al. 2013

Figure 4: principe de la technique de centrifugation sur gradient de sucrose

La régulation des voies de signalisation des récepteurs est due au fait que les protéines contenues dans les microdomaines sont réparties de manière aléatoire, ce qui fait qu'un récepteur devant se dimériser pour être activé aura plus de difficulté à retrouver sa moitié. Il existe trois types de protéines de membrane, celles qui ont une affinité pour les microdomaines, celles qui n'en ont pas et celles qui ont un changement d'affinité en fonction de la dimérisation ou de la liaison du ligand ou encore par une modification post-traductionnelle telles que la palmitoylation. De plus, via des signaux, les microdomaines vont coalescer ensemble pour former des clusters et permettre ainsi la rencontre de ces protéines. Les auteurs suggèrent que cet assemblage se fait soit par liaison du ligand au niveau du domaine extracellulaire, soit par dimérisation des récepteurs ou par la protéine LAT (linker of activation of T-cell) au niveau de la membrane. De plus, des adaptateurs, les protéines d'échafaudage ou encore la modulation du cytosquelette permettraient la formation de ces clusters (Voir figure 3) (Gniadecki and Bang, 2003; Simons and Ehehalt, 2002; Simons and Sampaio, 2011; Simons and Toomre, 2000).

Par ailleurs, les microdomaines lipidiques ont pour but de concentrer les récepteurs dans l'intention de faciliter les interactions de ces récepteurs avec les ligands au niveau extracytoplasmique mais également avec les effecteurs intracytoplasmiques. Ils préviennent aussi les interactions inadéquates entre les voies de signalisation. Ces domaines permettent l'activation des voies de signalisation des récepteurs aux cellules T, aux protéines G, à activité tyrosine kinase, ou encore la signalisation de FcεRI (high-affinity IgE receptor), d'EGFR (epithelial growth factor receptor), de VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), de PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) et de NGFR (nerve growth factor receptor) (Gniadecki and Bang, 2003; Pike, 2005; Simons and Ikonen, 1997).

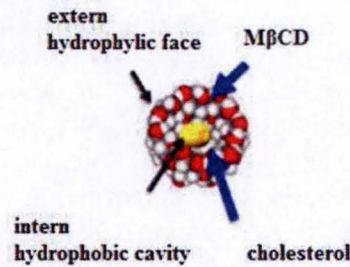
La visualisation des microdomaines lipidiques

La visualisation des microdomaines lipidiques n'est pas évidente, c'est pour cela que les avis sur l'existence de ces domaines sont divergents. Cette difficulté est due au fait que les microdomaines sont des domaines de l'ordre du nanomètre même si après coalescence de différents domaines, il peut atteindre l'ordre du micromètre. Cela peut être dû, entre autres à la dynamique des microdomaines. Malgré cela, certaines techniques permettent de suggérer leur présence telles que la microscopie à transmission d'électrons (MET), la microscopie à fluorescence par des sondes se fixant aux microdomaines et la centrifugation sur gradient de sucrose (Jensen *et al.*, 2009; Kabouridis *et al.*, 2000; Pike, 2005; Simons and Ehehalt, 2002; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000).

La centrifugation sur gradient de sucrose se base sur la densité de la protéine. Les cellules sont traitées au triton X100 dans le but de séparer les parties de la membrane détergent-résistantes de celles non résistantes aux détergents. Ensuite le tout est centrifugé dans un gradient de sucrose. Après cela le surnageant des différents gradients est récupéré dans un eppendorf pour pouvoir analyser la présence de protéines d'intérêt, ici les protéines associées aux microdomaines lipidiques, c'est-à-dire avec une faible densité (Voir figure 4). Par contre cette technique induit des faux négatifs. En effet si la protéine d'intérêt ne se trouve pas dans le faible gradient de sucrose cela ne veut pas dire qu'elle ne se situe pas dans les microdomaines. Elle peut soit être restée attachée au cytosquelette soit être détachée des microdomaines pendant la lyse des cellules (Raschke *et al.*, 2009; Simons and Ehehalt, 2002; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000).

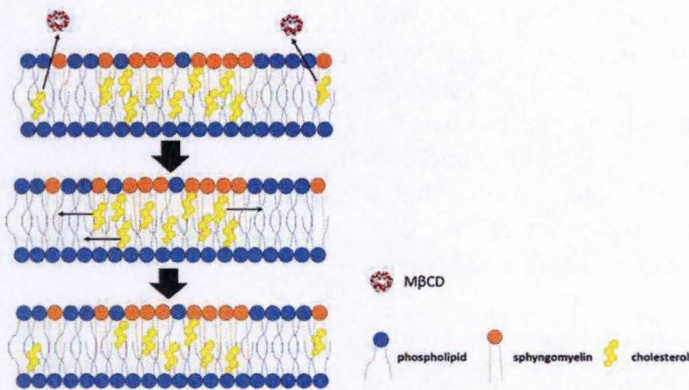
A

Methyl- β -cyclodextrin

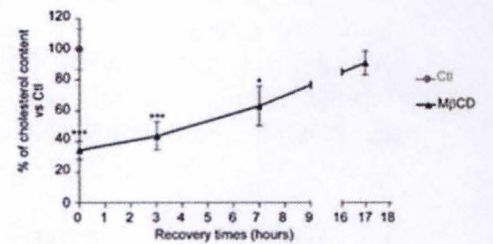


Adapted from M. Bourtembourg 2016

B



C



Giltaire et al. 2011

Figure 5: (A) molécule de la MβCD (B) schématisation de la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique par la MβCD (C) graphique représentant le taux relatif du cholestérol dans les kératinocytes après traitement à la MβCD et lors de la récupération. Les cellules ont été traitées à la MβCD pendant 1h et des temps de récupération jusqu'à 17 heures ont été réalisés. Le cholestérol a été extrait et quantifié avec le kit « Amplex Red Cholesterol Assay ». Les tests statistiques sont réalisés avec l'Anova 1 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

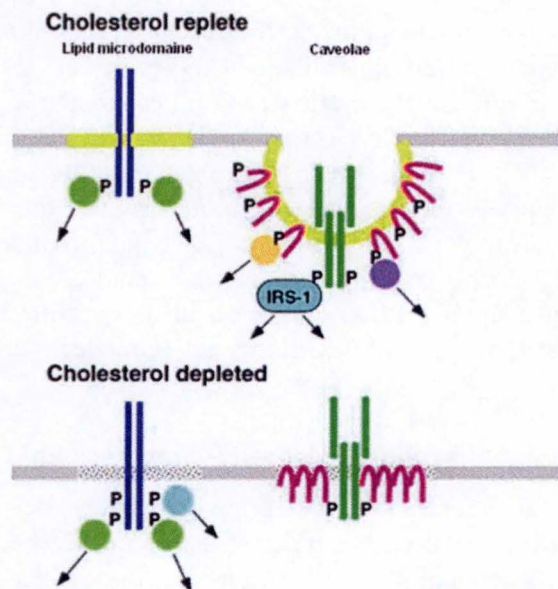
Concernant la visualisation par microscopie à fluorescence, les sondes utilisées sont les suivantes : la choléra toxine modifiée (CTx), la lysénine et les bodipy-SM (boron-dipyrrromethene-sphingomyéline). La choléra toxine (CT) est constituée de 5 sous-unités B et une sous-unité A qui est responsable de l'activation de l'adénylate cyclase et donc de la toxicité de la toxine. La CTx ne contient pas cette sous-unité A et est couplée à un fluorochrome pour être visualisée. CTx se lie spécifiquement aux sphingomyélines pour être plus tard endocytée. La lysénine est une sonde couplée au m-Cherry (rouge) qui se lie également spécifiquement aux sphingomyélines. Par contre le bodipy-SM est une sphingomyéline modifiée et couplée au bodipy qui est un fluorochrome vert. Le bodipy-SM va venir s'insérer entre les sphingomyélines endogènes (Gniadecki and Bang, 2003; Mound *et al.*, 2017).

La régulation des voies de signalisation par les microdomaines lipidiques

Certains auteurs ont voulu étudier la régulation des voies de signalisation par les microdomaines lipidiques. Pour ce faire, ils ont désorganisé ces microdomaines en enlevant le cholestérol. Plusieurs moyens peuvent être utilisés. Les microdomaines peuvent être perturbés en bloquant la synthèse de cholestérol par la lovastatine qui est un inhibiteur de l'hydroxyméthylglutaryl-coA réductase ou par l'U18666A qui inhibe le trafic du cholestérol. La désorganisation peut aussi se faire soit par la filipin III qui est un antibiotique formant des complexes globulaires multimériques avec le cholestérol dans la membrane, soit par oxydation du cholestérol qui inhibe la formation de ces microdomaines, soit par la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) qui capture le cholestérol présent de la membrane plasmique (Bang *et al.*, 2005; Pike, 2005).

La M β CD est principalement utilisée pour deux raisons. Comme dit plus haut, cette molécule capture le cholestérol de la membrane plasmique perturbant les microdomaines. Par ailleurs, les kératinocytes récupèrent le taux de cholestérol de base en la synthétisant d'eux-mêmes. Comme montré sur le graphique (Voir figure 5c), les cellules traitées par la M β CD 7,5 mM pendant une heure montrent une diminution de 70% en concentration de cholestérol mais après 17 heures de récupération, les cellules sont capables de récupérer leur taux de cholestérol de base. De plus, le traitement des cellules par la M β CD induit la déphosphorylation et donc l'activation d'AKT qui est une protéine pro-apoptotique. Après les 17 heures de récupération, l'AKT est de nouveau phosphorylé. La cellule a donc commencé un processus d'apoptose qui est inhibé par la resynthèse du cholestérol migrant en membrane et donc par une réorganisation des microdomaines. Cela suggère également que l'intégrité des microdomaines est importante pour la survie cellulaire (Bang *et al.*, 2005; Giltaire *et al.*, 2011; Jans *et al.*, 2004; Kabouridis *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2008).

La M β CD (Voir figure 5a) est une molécule constituée de 7 monomères de glucose contenant une face externe hydrophile et une cavité interne hydrophobe ayant une affinité pour le cholestérol. L'affinité est due à la taille de la cavité qui est la même que celle du cholestérol c'est-à-dire 0,78 nm. La façon dont la M β CD capture le cholestérol n'est pas encore claire. Certains chercheurs suggèrent que le cholestérol est capturé au niveau des membranes désordonnées ce qui permet le mouvement du cholestérol se trouvant dans les microdomaines hors de celle-ci pour permettre le rééquilibre (Voir figure 5b). Cela induit donc une perte de cholestérol dans les microdomaines et donc sa désorganisation. La littérature a rapporté que traiter les cellules à concentration de 7,5 mM pendant une à deux heures était optimal pour la survie cellulaire. En effet, une concentration élevée en M β CD avec un faible timing ou bien une concentration faible mais un timing élevé induit une mort cellulaire (Bang *et al.*, 2005; De



Pike 2005

Figure 6: Schématisation de la régulation des récepteurs avant (Cholesterol replete) et après (cholesterol depleted) traitement à la MβCD

In vitro

Gene name	Recovery time	Fold change	P-value
FLG	0h	-2.11	1.2.0E-02
IVL	8h	-2.4	3.0E-05
LOR	8h	-4.28	3.2E-03
IL-8	1h	545.62	4.5E-06
HB-EGF	1h	44.45	5.6E-14
TGM1	8h	4.55	4.9E-03
PLAUR	1h	78.1	1.2E-06

Gene name	Recovery time	Fold change	P-value
IL-4Rα	8h	18.78	2.1E-05
IL-13Rα1	8h	5.29	1.34E-08
IL-13Rα2	8h	306.04	2.38E-13

In vivo

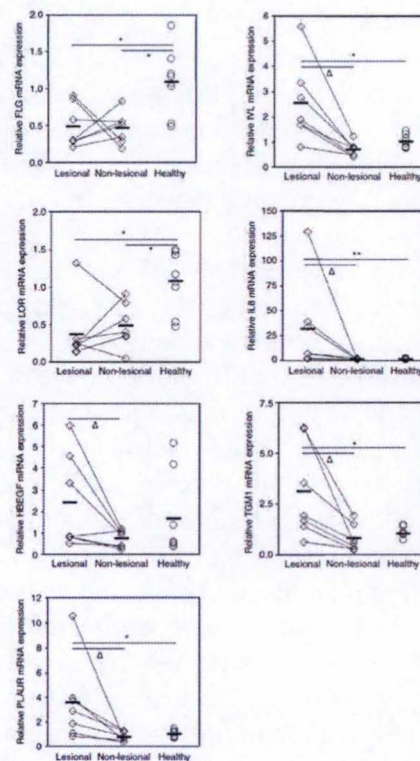


Figure 7: Expression relative en ARNm dans les kératinocytes déplétés en cholestérol (in vitro) et dans les peaux de patients atteints de DA en comparaison à des peaux saines (in vivo).

Vuyst, 2016; De Vuyst *et al.*, 2016a; Giltair *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2013; Mathay *et al.*, 2011; Pike, 2005).

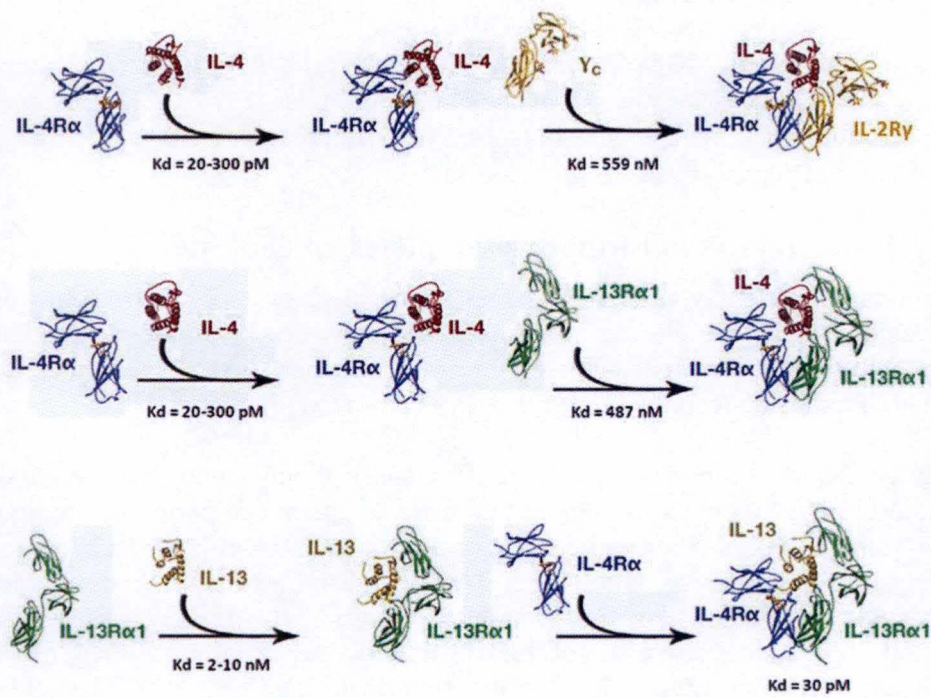
Le traitement des cellules par la M β CD a tendance à sous-exprimer les voies de signalisation des récepteurs se trouvant dans les microdomaines lipidiques tels que l'EGFR alors que dans les cavéoles, où se trouve le récepteur à l'insuline par exemple, le traitement a des effets inverses (voir figure 6) (Pike, 2005).

Profil transcriptionnel des kératinocytes déplétés en cholestérol

Dans notre laboratoire, Mathay et ses collègues ont réalisé un *microarray* dans le but d'évaluer la régulation d'expression de plusieurs gènes dans des kératinocytes déplétés en cholestérol. Pour ce faire, les cellules subissent un traitement par la M β CD 7,5 mM pendant une heure, suivis de temps de récupération de 0, 1 et 8 heures (Mathay *et al.*, 2011).

Par cette technique, des similitudes dans le profil transcriptionnel entre les kératinocytes déplétés en cholestérol et les peaux lésionnelles de patients atteints de dermatite atopique ont été retrouvées (Voir figure 7). La dermatite atopique est une maladie inflammatoire de la peau donnant une réponse immune de type Th2. Dans les deux profils, une diminution de l'expression relative en ARNm de la filaggrine et de la loricrine est observée alors qu'une augmentation de l'expression relative en ARNm de l'involucrine, de la transglutaminase 1, de l'HB-EGF (heparin binding-EGF like), d'IL (interleukine)-8 et de PLAU/PLAUR (plasminogen urokinase receptor) est rapportée. HB-EGF est un ligand d'EGFR tandis qu'IL-8 est une interleukine sécrétée suite à l'activation de ce récepteur jouant un rôle dans l'inflammation en recrutant les neutrophiles au site de l'inflammation. PLAU/PLAUR permettent quant à eux la synthèse du cholestérol. Ils jouent également un rôle dans l'activité fibrinolytique permettant l'activation du plasminogène, dans l'adhésion et dans la migration cellulaires (De Vuyst *et al.*, 2016b; Frankart *et al.*, 2012a; Giltair *et al.*, 2011; Hayward *et al.*, 2017; Mathay *et al.*, 2008; Mathay *et al.*, 2011).

De plus, une augmentation relative en ARNm d'IL-13R α 2, et moindre d'IL-4R α et IL-13R α 1 est observée dans les kératinocytes déplétés en cholestérol (Voir figure 7). IL-4R α et IL-13R α 1 sont des sous-unités du récepteur aux interleukines 4 et 13, cytokines surexprimées dans la dermatite atopique. IL-13R α 2, quant à lui, est un récepteur considéré comme un récepteur leurre des voies de signalisation d'IL-13. Ce récepteur est produit notamment par ces deux cytokines. Ces récepteurs sont décrits plus en détails au point suivant (De Vuyst *et al.*, 2017; LaPorte *et al.*, 2008; Mathay *et al.*, 2011).



LaPorte et al. 2008

Figure 8: schématisation de la formation des récepteurs de type 1 et de type 2

Les récepteurs aux interleukines 4 et 13

Les récepteurs aux IL-4 et -13 sont au nombre de trois : les récepteurs de type 1, de type 2 et IL-13R α 2 (Gandhi *et al.*, 2014).

Type 1

Général

Le récepteur de type 1 est formé de deux sous-unités, IL-4R α et IL-2R γ . Les gènes de ces récepteurs se trouvent respectivement sur le chromosome 16 et le chromosome X. IL-4R α a un poids moléculaire de 140 kDa alors que celui d'IL-2R γ est de 64 kDa. Ces deux sous-unités contiennent un domaine fibronectine-III et une boxe WSXWS, formant ensemble le coude CHR (cytokine binding homology region) qui lie les interleukines au niveau de leurs hélices. Ce récepteur se trouve au niveau de cellules hématopoïétiques telles que les lymphocytes T et B, les macrophages, les cellules NK (natural killer), etc. (Andrews *et al.*, 2006; Haque *et al.*, 1998; Hussein *et al.*, 2014; Khoo *et al.*, 2006; LaPorte *et al.*, 2008; Murata *et al.*, 1998; Tabata and Khurana Hershey, 2007; Waickman *et al.*, 2016).

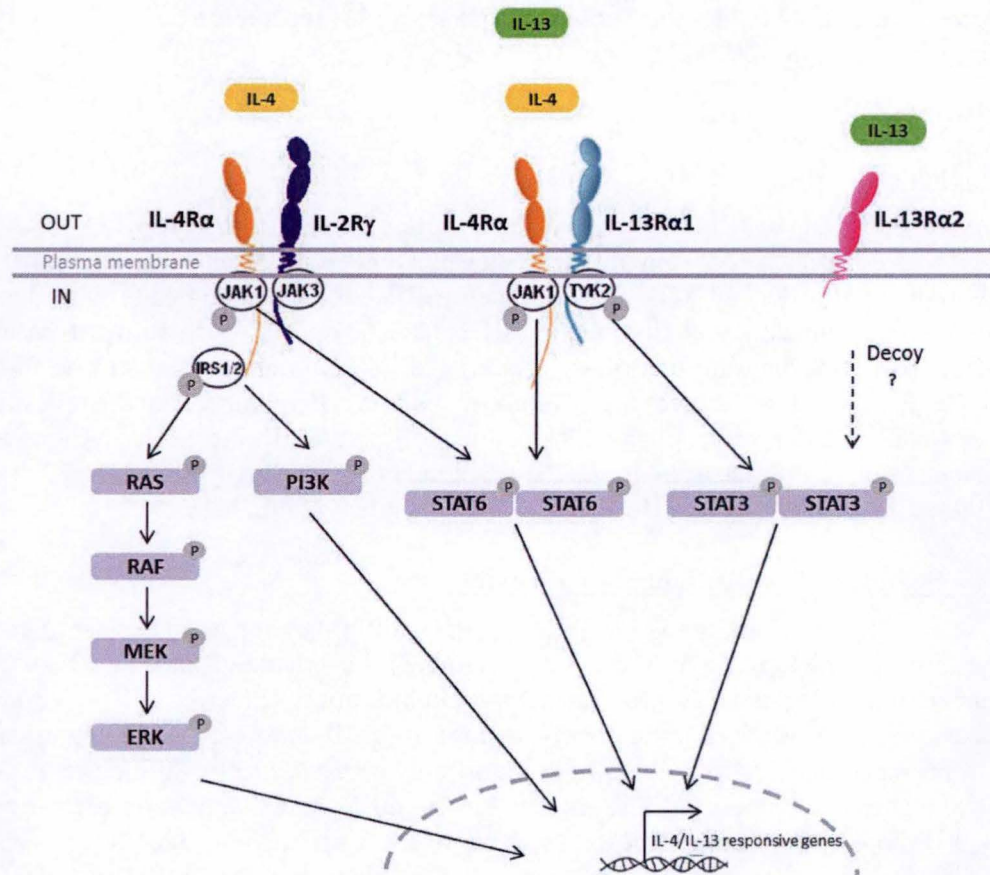
Le ligand, la dimérisation et l'endocytose

L'IL-4 lie IL-4R α avec une grande affinité ($K_d=20-300$ pM) pour se dimériser avec IL-2R γ avec une faible affinité ($K_d = 559$ nM) (Voir figure 8). La grande affinité de l'IL-4 pour son récepteur se fait grâce à leurs propriétés physicochimiques. En effet, l'IL-4 contient des résidus basiques et est donc chargée positivement alors qu'IL-4R α est chargé négativement du fait de la présence de résidus acides. Cela induit une attirance électrostatique entre les deux molécules. Cette différence d'affinité est due au fait qu'IL-4 recherche son récepteur sur un plan en 3 dimensions et a donc besoin d'avoir une grande affinité avec son récepteur. A l'inverse, le complexe IL-4R α -IL-4 recherche IL-2R γ dans un plan en 2D et l'affinité peut donc être plus faible (Andrews *et al.*, 2006; Gandhi *et al.*, 2014; Kioi *et al.*, 2004; LaPorte *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2002; Ul-Haq *et al.*, 2016).

De plus IL-2R γ , du fait de sa constante de dissociation élevée, est considérée comme un activateur catalytique qui fait des allers-retours entre les complexes IL-4R α -IL-4. IL-2R γ va donc agir transitoirement pour activer les voies de signalisation (Andrews *et al.*, 2006).

Kurgonaite et ses collègues ont également rapporté une augmentation de la stabilité du récepteur de type II dans les endosomes corticaux au niveau des cellules HEK293T en transfectant IL-2R γ et IL-4R α couplées à un fluorochrome dans ces cellules. Une fois l'IL-4 lié à son récepteur, IL-4R α est endocyté dans les endosomes corticaux pour concentrer cette sous-unité au niveau de la membrane de l'endosome. Celui-ci reste sous la membrane plasmique et ne passe pas dans la voie lysosomiale. IL-2R γ est également endocyté par réorganisation du cytosquelette. En effet, cette endocytose est médiée par l'actine, rac1 et pak1 et la liaison du ligand au récepteur n'est donc pas nécessaire. Grâce à cette concentration au niveau de la membrane de l'endosome, la constante de dissociation entre le complexe IL-4R α -IL-4 et IL-2R γ diminue ce qui permet une activation de la voie de signalisation du récepteur. Ces endosomes servent également de lieu de stockage d'IL-4R α qui sera recyclé à la membrane plasmiques (Gandhi *et al.*, 2014; Kurgonaite *et al.*, 2015).

Enfin, des études ont rapporté qu'au niveau des cellules rénales, IL-4R α est distribué de façon homogène dans le cytoplasme mais pas dans la membrane plasmique suggérant que ce



Adapted from
M.Bourtembourg 2016

Figure 9: voie de signalisation des récepteurs aux interleukines 4 et 13

récepteur est situé au niveau des microdomaines lipidiques. Cela pourrait amener à une régulation de cette sous-unité par les microdomaines lipidiques (Gandhi *et al.*, 2014).

Le récepteur de type I est formé seulement par l'IL-4 mais IL-2R γ a la possibilité de se dimériser avec d'autres sous-unités de récepteurs formant des récepteurs fonctionnels. Ces récepteurs sont les récepteurs à l'IL-2 (IL-2R α /IL-2R β), l'IL-7 (IL-7R α), l'IL-9 (IL-9R α), l'IL-15 (IL-2R β /IL-15R α) et l'IL-21 (IL-21R α) (Gandhi *et al.*, 2014; LaPorte *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2013; Rahaman *et al.*, 2002).

La signalisation

Une fois le récepteur formé, celui-ci induit plusieurs voies de signalisation. Pour cela, un changement de conformation 3D d'IL-4R α est réalisé (Voir figure 9) (Gandhi *et al.*, 2014).

Les premières voies de signalisation sont induites par JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal transducer and activator of transcription). JAK1 est recruté au niveau d'un des cinq résidus tyrosines d'IL-4R α et JAK3 est lui recruté au niveau d'IL-2R γ même si cette sous-unité ne contient pas de résidus tyrosines. JAK 1 et 3 phosphorylent la sous-unité du récepteur dans le but de phosphoryler STAT-6. Une fois phosphorylé, STAT-6 dimérise ensemble ce qui va permettre sa translocation dans le noyau régulant la transcription de gènes cibles (Andrews *et al.*, 2006; Haque *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2015; Rahaman *et al.*, 2002; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

Les deuxièmes voies de signalisation sont induites par IRS1/2 (insulin receptor substrate) qui est recruté et phosphorylé au niveau d'un résidu tyrosine d'IL-4R α . IRS1/2 va activer deux voies de signalisation. Premièrement, PI3K (phosphatidylinositol-3-phosphate) est phosphorylé et clive PIP₂ (phosphatidylinositol diphosphate), se trouvant en membrane, en PIP₃ (phosphatidylinositol triphosphate). Cela induit l'activation d'AKT. IRS1/2 induit également des cascades de kinases. RAS (rat sarcoma) est activé, ce qui active RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma), lui-même phosphorylant MEK (extracellular signal-regulated kinase kinase) qui enfin phosphoryle ERK (extracellular signal-regulated kinases). ERK va transloquer au niveau du noyau pour transcrire les gènes cibles (Bhatt and Damania, 2012; Haque *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2015).

Type 2

Général

Le récepteur de type 2 est formé de deux sous-unités, IL-4R α et IL-13R α 1. Le gène d'IL-13R α 1 comme celui d'IL-2R γ se trouve sur le chromosome X. IL-13R α 1 a un poids moléculaire de 65 kDa. IL-2R γ et IL-13R α 1 avec 26% d'homologie, ont un ancêtre commun mais la particularité d'IL-13R α 1 par rapport à IL-2R γ est qu'il contient un domaine Ig-like au niveau N-terminal. Ce domaine contient un site de liaison au niveau de la partie dorsale de l'IL-13 et l'IL-4. IL-13R α 1 est constitué entre autre d'un coude CHR et aussi, à l'instar d'IL-4R α et IL-2R γ , d'un domaine boîte 1 riche en proline et de 4 résidus cystéines. La région boîte 1 permet une liaison de JAK (David *et al.*, 2001; LaPorte *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2002; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

Ce récepteur se trouve au niveau des cellules non hématopoïétiques telles que les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales mais également au niveau des cellules hématopoïétiques telles que les lymphocytes B ou les monocytes. Par contre ce récepteur ne

se situe pas sur la membrane plasmique des lymphocytes T. C'est pour cela que seule l'IL-4 induit le switch de lymphocytes T en lymphocytes Th2 (Akaiwa *et al.*, 2001; Daines and Hershey, 2002; David *et al.*, 2001; LaPorte *et al.*, 2008).

Les ligands et la dimérisation

Ce récepteur se forme de deux façons, par liaison de son ligand, l'IL-4 ou l'IL-13. L'IL-4 lie IL-4R α avec une grande affinité (K_d = 20-300 pM) et ce complexe lie ensuite IL-13R α 1 avec une faible affinité (K_d =487 nM) (Voir figure 8). A l'instar du récepteur de type I, IL-4R α et IL-13R α 1 interagissent avec l'IL-4 (Gandhi *et al.*, 2014; Kioi *et al.*, 2004; LaPorte *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2002; Ul-Haq *et al.*, 2016).

Par contre l'IL-13 lie IL-13R α 1 avec une faible affinité (K_d = 2-10 nM). Mais une fois que ce complexe se lie à IL-4R α , l'affinité augmente (K_d = 30 pM) (Voir figure 8). A l'instar de l'IL-4, une fois sur son récepteur, l'IL-13 interagit avec IL-4R α (Daines and Hershey, 2002; Kioi *et al.*, 2004; LaPorte *et al.*, 2008; Miloux *et al.*, 1997; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

L'affinité d'un récepteur se calcule de la manière suivante : K_d = constante de dissociation / constante d'association et plus le K_d est petit, plus l'affinité est grande. De ce fait, comme IL-4R α stabilise la liaison entre l'IL-13 et IL-13R α 1, la constante de dissociation diminue, ce qui augmente l'affinité du récepteur. La formation du récepteur par l'IL-13 est ainsi plus favorable énergétiquement que par l'IL-4 (Benson *et al.*, 2010; LaPorte *et al.*, 2008).

La cinétique dans le temps est importante. La deuxième sous-unité du récepteur ne se lie pas à la première sous-unité tant que l'IL-4 ou l'IL-13 n'a pas lié respectivement IL-4R α ou IL-13R α 2. De plus ces deux sous-unités ne peuvent induire de signalisation tant que les deux sous-unités n'ont pas dimérisées ensemble (Andrews *et al.*, 2002; Miloux *et al.*, 1997).

La signalisation

Ce récepteur induit plusieurs voies de signalisation, une fois la dimérisation d'IL-4R α et d'IL-13R α 1 effectuée (Voir figure 9).

Premièrement, JAK1 est recruté et phosphoryle un des cinq résidus tyrosines d'IL-4R α . JAK-1, étant une tyrosine kinase, va phosphoryler les résidus tyrosines de STAT-6. STAT-6 phosphorylés dimérisent ensemble permettant sa translocation dans le noyau pour réguler la transcription de nombreux gènes d'intérêts (Gandhi *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Rahaman *et al.*, 2002; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

La deuxième voie de signalisation est induite par le recrutement de TYK2 (tyrosine kinase) /JAK2 au niveau d'un des deux résidus tyrosines d'IL-13R α 1 qui va permettre la phosphorylation de STAT-3. STAT-3 phosphorylé dimérise et transloque également au niveau du noyau pour réguler la transcription de gènes cibles (Huang *et al.*, 2015; Rahaman *et al.*, 2002; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

L'IL-4 et l'IL-13 induisent la phosphorylation de STAT-6 de manière différente. Pour phosphoryler STAT-6, de faibles doses de l'IL-4 sont suffisantes contrairement à l'IL-13. De plus, l'IL-4 induit une phosphorylation plus rapide et atteint donc un plateau plus rapidement (LaPorte *et al.*, 2008).

IL-13R α 2

Général

Le gène qui code pour IL-13R α 2 se situe sur le chromosome X. IL-13R α 2 présente 37% d'homologie avec IL-13R α 1, ce qui fait qu'ils lient tous deux le même ligand. Le poids moléculaire du récepteur est de 56 kDa. IL-13R α 2 est surexprimé dans les testicules et les cancers et induit par l'IL-4, l'IL-13 et le TNF- α (tumor necrosis factor α) (Andrews *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 1998; Hussein *et al.*, 2011; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

La particularité d'IL-13R α 2 est que ce récepteur contient une courte queue cytoplasmique, ne contenant pas de motifs de signalisation, l'empêchant d'induire normalement une signalisation. En effet, ce récepteur est considéré comme un récepteur antagoniste (Akaiwa *et al.*, 2001; Wongpiyabovorn *et al.*, 2003).

IL-13R α 2 comme récepteur antagoniste

IL-13R α 2 lie l'IL-13 avec une plus grande affinité qu'IL-13R α 1 ($K_d = 0,25$ nM) du fait d'un taux d'association plus rapide et un taux de dissociation plus lent stabilisant ainsi la liaison de l'IL-13. Le domaine transmembranaire peut être responsable de cette augmentation d'affinité (Voir figure 8). Cela induit que l'IL-13 va préférentiellement se lier à IL-13R α 2 (Voir figure 9). Etant donné que normalement ce récepteur ne peut induire de signalisation, sa liaison à l'IL-13 va inhiber la transduction du signal de cette cytokine par son internalisation, empêchant donc l'IL-13 de se lier à son récepteur, IL-13R α 1. En effet, il est rapporté qu'IL-13R α 2 induit une diminution de la phosphorylation de STAT-6 et de la production de l'éotaxine. De plus, ce récepteur est dégradé par des allergènes lors de maladies allergiques (Andrews *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2015; Kawakami *et al.*, 2001; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

IL-13R α 2 se trouve dans les trois compartiments : en intracellulaire, en membrane et en extracellulaire. En intracellulaire, des pools de stockage sont présents sous la membrane plasmique. Lorsque l'IFN (interferon) γ augmente par réponse à des signaux cellulaires, IL-13R α 2 migre au niveau de la membrane plasmique pour jouer son rôle de récepteur antagoniste. Chez la souris, une forme soluble de ce récepteur a été révélée soit par clivage au niveau de son domaine extra-cytoplasmique par des métalloprotéinases, soit par épissage alternatif de son ARNm. IL-13R α 2 soluble a 3 fois plus d'affinité pour l'IL-13 qu'IL-13R α 2 membranaire. Etant donné que cette forme du récepteur se trouve dans les espaces interstitiels, il peut effectuer son rôle à des distances plus espacées de la cellule qui l'a sécrété. Chez la souris, une concentration 10 fois plus élevée d'IL-13R α 2 soluble comparée à l'IL-13 est retrouvée. Par contre, la forme soluble de cette protéine n'a pas encore été révélée chez l'humain (Andrews *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2009; Daines *et al.*, 2006; Hussein *et al.*, 2011; O'Toole *et al.*, 2008; Tabata and Khurana Hershey, 2007; Wongpiyabovorn *et al.*, 2003).

Des études ont également montré qu'IL-13R α 2 induit une inhibition de la signalisation de l'IL-4 en l'absence d'une liaison entre ces deux protéines. La façon dont IL-13R α 2 inhibe la signalisation de l'IL-4 n'est pas encore claire mais des hypothèses sont avancées. Certains auteurs suggèrent qu'il inhibe cette signalisation en internalisant soit IL-4R α soit IL-13R α 1 par sa queue cytoplasmique (Andrews *et al.*, 2006; Andrews *et al.*, 2009; Rahaman *et al.*, 2002; Tabata and Khurana Hershey, 2007).

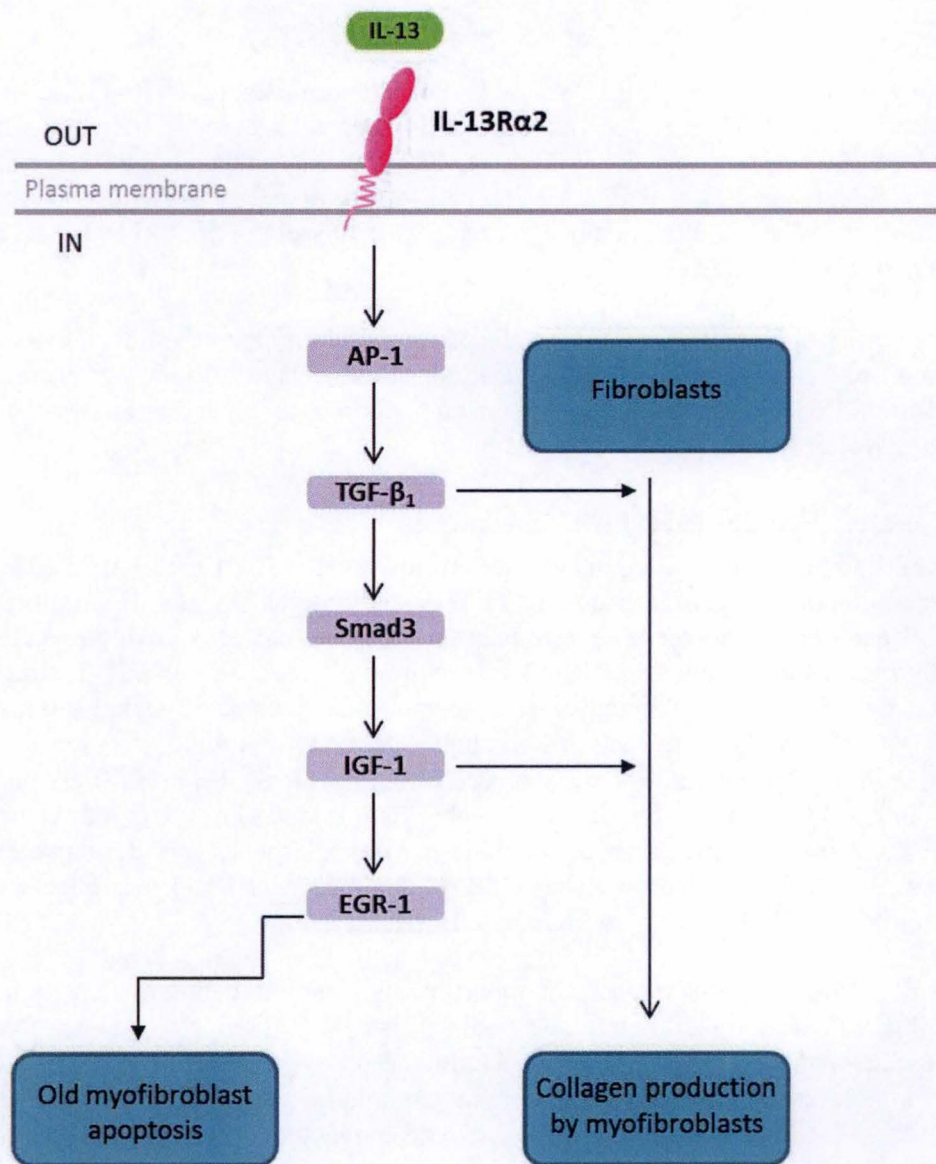


Figure 10: voie de signalisation d'IL-13Ra2 dans l'induction de la fibrose

La signalisation

Malgré sa courte queue cytoplasmique et le fait qu'il ne contient donc pas de motifs de signalisation suggérant qu'IL-13R α 2 ne peut activer des voies de signalisation, certaines études ont démontré le contraire au niveau des poumons et du colon (Andrews *et al.*, 2009; Fichtner-Feigl *et al.*, 2008).

Fichtner-Feigl et son équipe ont injecté à des souris balb/C du TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique) ce qui va induire la fibrose chez la souris. La fibrose est une accumulation du tissu conjonctif, principalement le collagène, dans les organes creux obstruant les voies de ces organes. La voie de signalisation induite par l'IL-13 passant par IL-13R α 2 a été montrée par des siRNA dirigés contre IL-13R α 2 et des oligonucléotides leurres dirigés contre les éléments en aval de la signalisation (Fichtner-Feigl *et al.*, 2008).

Une fois la liaison de l'IL-13 à IL-13R α 2, AP (activator protein)-1 est activé. Étant un facteur de transcription, celui-ci va induire la transcription de TGF- β 1 (transforming growth factor). TGF- β 1 va alors jouer deux rôles. Premièrement, il va activer les fibroblastes en les transformant en myofibroblastes. Ceux-ci vont produire énormément de collagène de type I responsable de la fibrose. Deuxièmement, il va induire l'activation de Smad3 (Mothers Against DPP Homolog) qui à l'instar d'AP-1 est un facteur de transcription activant la transcription du gène d'IGF (insulin-like growth factor)-1. Cette protéine joue également deux rôles. Le premier est l'induction de la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et le deuxième est l'activation d'Egr (Early growth response)-1. Egr-1 va induire l'apoptose des myofibroblastes en augmentant la protéine pro-apoptotique caspase-3. En effet, les vieux myofibroblastes inhibent la génération des nouveaux myofibroblastes qui produisent une quantité énorme de collagènes de type I. De ce fait, l'apoptose de ces vieux myofibroblastes en addition avec la production de nouveaux myofibroblastes est nécessaire pour l'apparition de la fibrose (Voir figure 10) (Andrews *et al.*, 2009; Fichtner-Feigl *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2015).

Les inhibiteurs des récepteurs aux interleukines 4 et 13

Les inhibiteurs naturels de la signalisation de ces cytokines sont les SOCS (suppressor of cytokines signalling), les phosphatases à protéines tyrosines (PTP) et le récepteur IL-13R α 2. Contrairement à ce dernier, les deux autres inhibiteurs n'ont pas d'effets spécifiques sur la signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13 mais sur toutes les signalisations de cytokines ou de récepteurs tyrosines kinases. Deux PTP vont inhiber la signalisation de ces cytokines, PTPx qui se lie aux récepteurs et PTPy, aussi nommé shp-1 qui se lie sur STAT6 pour le déphosphoryler (Albanesi *et al.*, 2007; Haque *et al.*, 1998; Rahaman *et al.*, 2002).

Les SOCS sont au nombre de 8 dont deux vont jouer un rôle sur l'IL-4 et l'IL-13. SOCS1 contient un domaine SH2 pour se lier à la protéine JAK et donc inhiber la signalisation. SOCS3 quant à lui se lie sur le domaine intracellulaire des récepteurs au niveau des tyrosines phosphorylées. De plus ces inhibiteurs sont produits par ces interleukines par l'activation de STAT-6 (Albanesi *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2006; Kazi *et al.*, 2014; Larsen and Ropke, 2002)

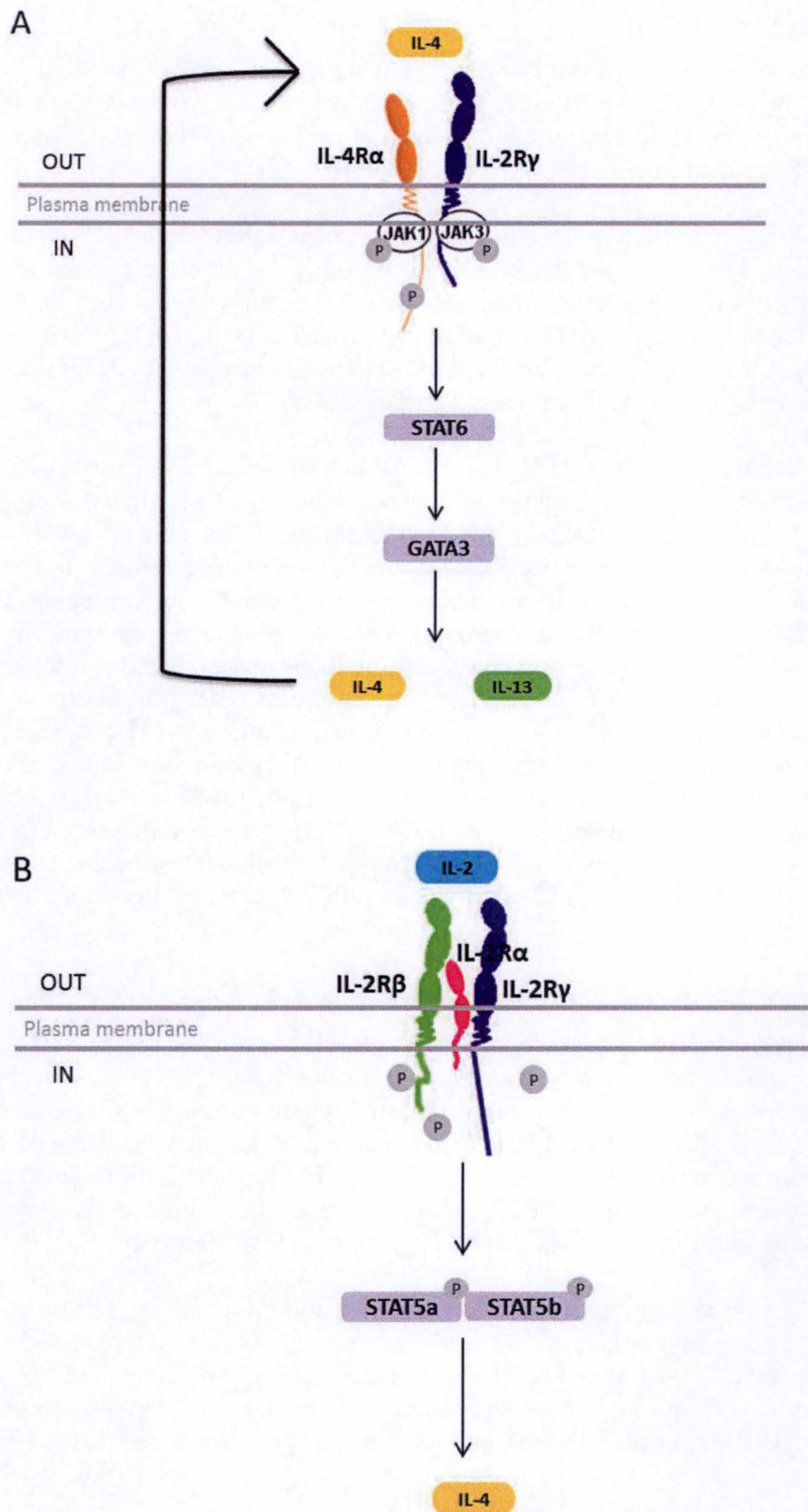


Figure 11: voies de signalisation de la production d'IL-4 dans les lymphocytes Th2 par IL-4 (A) et par IL-2 (B).

Les interleukines

La production de ces interleukines

L'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines pléiotropiques composées de 4 hélices α dont les gènes se situent sur le chromosome 5. Suite à la présence d'helminthes ou d'organismes extracellulaires, ces interleukines induisent une réponse inflammatoire de type Th2 pour les détruire. Mais une production exacerbée de ces interleukines induit des maladies allergiques telles que l'asthme par une augmentation de la production d'IgE (immunoglobuline E) (Andrews *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2014; Mueller *et al.*, 2002; Rahaman *et al.*, 2002; Ul-Haq *et al.*, 2016).

Les IL-4 et -13 sont sécrétées principalement par les lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T naïfs sont d'abord activés par les cellules présentatrices d'antigènes grâce à plusieurs signaux. Ils sont ensuite convertis en lymphocytes Th2. La production de ces interleukines se fait par plusieurs voies de signalisation (LaPorte *et al.*, 2008).

Dans la première (Voir figure 11a), l'IL-4 active STAT-6 en passant par le récepteur de type 1 à l'IL-4. STAT-6 va lui-même activer GATA-3, un facteur de transcription, qui permet la production et la sécrétion de cytokines telles que les IL-4 et -13 dans lymphocytes Th2. Une boucle d'amplification positive est ainsi induite (Huang *et al.*, 2015; Ul-Haq *et al.*, 2016; Zhu, 2015).

Dans la deuxième (Voir figure 11b), l'IL-2 en se liant à son récepteur va induire notamment la production des IL-4 et -13 dans les lymphocytes T. Parmi elles, l'IL-2 se lie à son récepteur pour activer STAT-5a et STAT-5b qui dimérisent ensemble, transloquent dans le noyau et se lient au site de liaison de STAT-5 au niveau de l'exon 2 du gène de l'IL-4 permettant sa transcription. Des études ont rapporté que GATA3 et STAT-5 sont tous deux nécessaires pour avoir une expression maximale de l'IL-4 (Zhu, 2015).

Dernièrement, d'autres études ont également montré que TSLP, produit par des kératinocytes différenciés et en plus grande quantité par les kératinocytes de patients atteints de dermatite atopique, peut activer les cellules dendritiques promouvant le switch des lymphocytes en Th2. Comme la voie STAT-6/GATA3, cette voie induit une boucle d'amplification positive étant donné que les IL-4 et -13 sécrétées par les lymphocytes Th2 surexpriment l'expression de TSLP (thymic stromal lymphopoietin). En plus d'être produites par les lymphocytes Th2, ces interleukines sont sécrétées par les cellules NK, les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles (Bogiatzi *et al.*, 2007; David *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2015; Rahaman *et al.*, 2002).

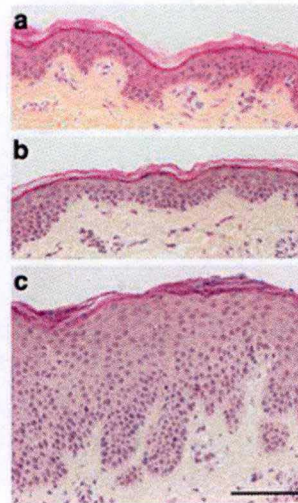
La fonction des interleukines 4 et 13

Grâce à l'existence de 25% d'homologie entre l'IL-4 et l'IL-13 et au fait qu'elles se lient toutes deux sur le même récepteur (de type 2), ces interleukines ont des réponses cellulaires communes telles que l'augmentation des récepteurs à l'IgE sur les lymphocytes B, les basophiles et les mastocytes améliorant les réponses aux IgE. Elles jouent également un rôle dans l'augmentation de la production de ces IgE par les lymphocytes B, l'activation de macrophage en M2, l'augmentation de la production de VEGF (vascular endothelial growth factor) et de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) ce qui induit la migration de lymphocytes T, monocytes, basophiles et éosinophiles sur le site de l'inflammation. Ces interleukines permettent également l'activation des éosinophiles par l'augmentation de



Leung 2013

**Histological
features**



Healthy skin

**Non lesional skin
atopic dermatitis**

**Lesional skin
atopic dermatitis**

Malaisse et al. 2014

Figure 12: manifestations cliniques et caractéristiques histologiques de la DA.

l'expression d'éotaxine (Akaiwa *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2009; Daines and Hershey, 2002; David *et al.*, 2001; De Benedetto *et al.*, 2009; Kioi *et al.*, 2004; LaPorte *et al.*, 2008).

Malgré cela, l'IL-4 et l'IL-13 jouent des rôles distincts. Seule l'IL-4 permet le switch des lymphocytes T en lymphocytes Th2. L'IL-13 par contre joue un rôle crucial dans l'hypersensibilité des voies respiratoires supérieures et donc dans l'asthme en augmentant la production de mucus par induction du gène de la mucine et en permettant la contraction des muscles lisses respiratoires. Cette cytokine induit également une diminution de l'expression de l'IFN γ . L'IL-13 est aussi responsables de la fibrose pulmonaire ou du colon en augmentant la production de collagène par les fibroblastes (Andrews *et al.*, 2009; David *et al.*, 2001; Fichtner-Feigl *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2015; Kioi *et al.*, 2004; Wongpiyabovorn *et al.*, 2003).

De plus, ces interleukines agissent de manière différente en fonction des cellules par lesquelles elles sont produites et sécrétées. Par exemple, elles ont un rôle anti-inflammatoire dans les monocytes en diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires alors que dans les kératinocytes ou les cellules endothéliales, elles ont un rôle pro-inflammatoire en augmentant l'expression de l'IL-6. Dans les lymphocytes T, l'IL-4 augmente l'expression d'IL-4R α alors que dans les monocytes, les IL-4 et -13 diminuent l'expression d'IL-4R α et d'IL-13R α 1 mais augmentent l'expression d'IL-13R α 2. Il a été également montré qu'IL-13R α 2 est induit par l'IL-4 et l'IL-13 dans les kératinocytes en activant les voies de signalisation de STAT-6, ERK et P-38 alors qu'ERK et P-38 ne sont normalement pas activés par ces interleukines dans d'autres cellules (David *et al.*, 2001; Wongpiyabovorn *et al.*, 2003).

Par ailleurs, ces interleukines sont surexprimées dans les maladies inflammatoires de type Th2 telles que la dermatite atopique et participent donc à la formation de celles-ci.

La dermatite atopique

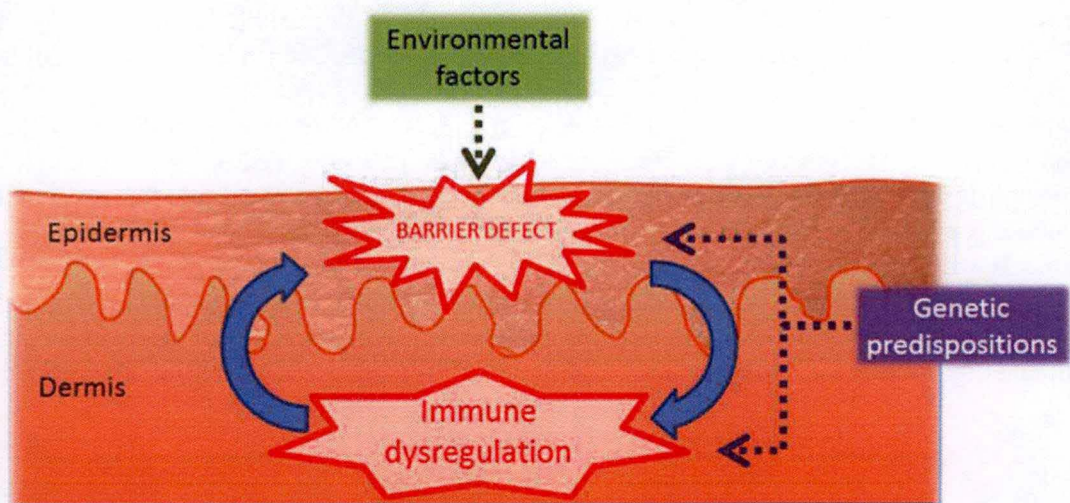
Général

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire de type Th2 de la peau dont 20 % des cas sont modérés à sévères. Cette maladie survient chez 15 à 30% d'enfants de jeune âge et en général disparaît à l'enfance même si elle peut persister chez 2 à 3% des adultes. La DA est principalement retrouvée dans les pays développés dont l'incidence a augmenté de 2 à 3 fois sur ces 3 dernières décennies. Malgré tout, une expansion de cette maladie est retrouvée dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, sa prévalence est moindre dans les zones rurales que dans les zones urbaines. Dans 15 à 30% des cas, la marche atopique est induite c'est-à-dire que les patients vont développer plus tard de l'asthme, de la rhinite allergique ou bien d'autres maladies atopiques (Beck *et al.*, 2014; Bieber, 2010; Cork *et al.*, 2009; De Benedetto *et al.*, 2009; De Vuyst *et al.*, 2016b; Simon and Bieber, 2014).

Il existe deux types de dermatite. 20 à 30% des patients ont la forme intrinsèque contenant un faible taux d'IgE et 70 à 80% ont la forme extrinsèque, aussi appelée dermatite atopique, avec une haute concentration de cette immunoglobuline. 80% des patients atteints de dermatite intrinsèque développe ensuite la DA (Cork *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009).

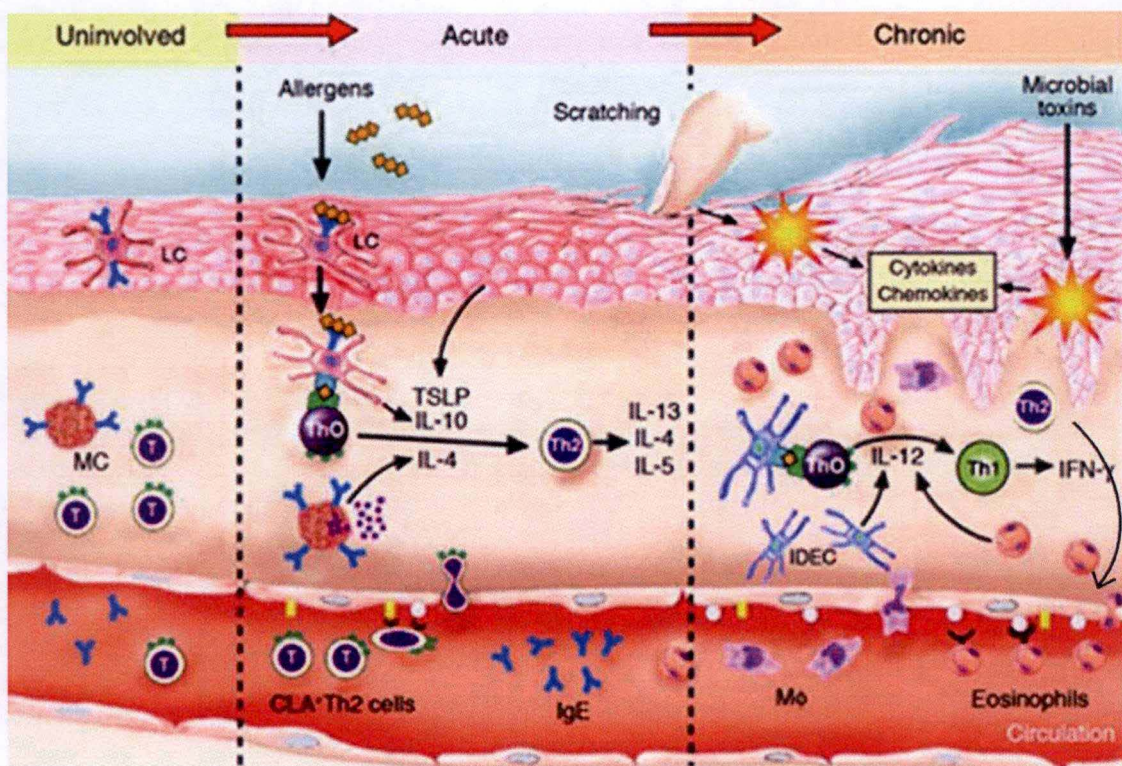
Les symptômes

Les symptômes de la DA (Voir figure 12) sont induits par la rupture de la barrière épidermique et la dérégulation du système immunitaire. La principale caractéristique de cette



De Vuyst et al. 2016

Figure 13: induction "inside-outside" et "outside-inside" de la DA.



Adapted from leung et al. 2004

Figure 14: schématisation de l'induction de la DA aiguë et chronique.

maladie est le prurit c'est-à-dire les démangeaisons au niveau de la peau. De plus, suite à une déshydratation, une sécheresse de la peau nommée xérosis va apparaître. Le patient, à force de se gratter, va induire des lésions érythémateuses (Cork *et al.*, 2009; De Benedetto *et al.*, 2009; De Vuyst *et al.*, 2016b).

La DA peut être également reconnue par des marques histologiques telles que la spongiose qui est une accumulation de liquide au niveau du compartiment interstitiel de l'épiderme séparant ainsi les cellules les unes des autres. L'épiderme va s'épaissir et une hypogranulose va apparaître au niveau de la couche granuleuse. Dans la phase chronique de la maladie une lichénification va se produire ce qui provoque une hyperplasie de l'épiderme. De plus, les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques, les éosinophiles et les lymphocytes T vont migrer du derme vers l'épiderme (Akaiwa *et al.*, 2001; Bieber, 2010; de Jongh *et al.*, 2005; De Vuyst *et al.*, 2017).

L'étiologie

Deux hypothèses sur l'induction de la DA sont avancées : l'induction « inside-outside » et l'induction « outside-in » (Voir figure 13). Dans les deux hypothèses, un cercle vicieux est engendré entre l'altération de la barrière et la réponse inflammatoire de type Th2. En effet, au niveau de la première hypothèse, une réponse immune excessive est induite dû à un problème génétique. Par cette réponse, une production excessive d'interleukines de type Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 est rapportée. Ces interleukines vont altérer la barrière ce qui induit une augmentation de l'infection virale et bactérienne, sécrétant des protéases dans le but de détruire la barrière. De plus, une barrière dysfonctionnelle laisse passer les pathogènes ou les allergènes au niveau de la peau. Ces molécules vont à leur tour induire une réponse immunitaire avec une production de ces cytokines. Dans la deuxième hypothèse, la barrière est d'abord altérée par des facteurs environnementaux ou génétiques ce qui induit une réponse immune de type Th2 suite à la pénétration accrue de pathogènes. La sécrétion des interleukines va dès lors provoquer une altération de la barrière et ainsi de suite (De Benedetto *et al.*, 2009; De Vuyst *et al.*, 2016b; Elias and Steinhoff, 2008).

La DA comporte deux phases (Voir figure 14). La première phase est la phase aiguë qui induit la réponse immune Th2 comme expliqué ci-dessus. Par contre, la deuxième phase, qui est la phase chronique, va induire une réponse immune de types Th2 et Th1 avec la production par exemple de TNF α et d'IFN γ (Hussein *et al.*, 2014; Leung, 2013).

Par ailleurs, la DA est une maladie multifactorielle. Le nombre de facteurs présents chez un patient détermine la sévérité de la maladie. Les différents facteurs sont les facteurs génétiques, immunologiques, environnementaux et épigénétiques (Cork *et al.*, 2009).

La génétique

Le facteur génétique de cette maladie est montré par des études réalisées sur des jumeaux. Cela révèle que si un des jumeaux monozygotes est atteint de la DA, l'autre aura plus de chance d'être atteint de la maladie comparé à des jumeaux dizygotes. Malgré cela, l'un des jumeaux ne sera pas d'office atteint si l'autre l'est ce qui implique le facteur d'environnement de cette maladie (Elmose and Thomsen, 2015; Jin *et al.*, 2009).

Dans cette maladie, des mutations de gènes sont principalement retrouvées au niveau du chromosome 1q21 dont les gènes sont responsables de l'homéostasie épidermique. Chez 30%

des patients atteints de DA en Europe, le gène de la FLG est retrouvé muté. Cela induit une déshydratation des cornéocytes qui se déforment. D'autres auront une mutation au niveau du gène codant pour la loricrine, l'involucrine ou d'autres protéines participant à la formation de l'enveloppe cornée et donc à la barrière épidermique. La barrière est également altérée par mutation sur le gène de la claudine 1 ou de la desmoglérine, protéines qui participent respectivement à la formation de jonctions serrées et de desmosomes. De plus, des mutations au niveau de gènes codant pour les anti-protéases sont induites, produisant une desquamation précoce (Bieber, 2010; De Benedetto *et al.*, 2009; De Benedetto *et al.*, 2011; Kamsteeg *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2016; Samuelov *et al.*, 2013).

Des mutations de gènes codant pour des protéines jouant un rôle dans l'immunité sont également retrouvées. Ces gènes codent pour TLSP, les IL-4 et -13 et leurs récepteurs et également STAT-6. De plus les TLR (toll-like receptor) sont surexprimés ce qui induit une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens. Cela mène à la colonisation de microbes tels que le *staphylococcus aureus* (*S. aureus*), à l'instar de mutations présentes au niveau de gènes codant pour des peptides antimicrobiens comme le DEFB1 (β -défensine 1) (Boguniewicz and Leung, 2011; Hussein *et al.*, 2014; Leung, 2013; Liang *et al.*, 2016).

L'immunologique

Les interleukines 4 et 13 jouent un rôle important dans la DA. Ces interleukines sont produites par les lymphocytes Th2, polarisés par TLSP qui est sécrété par les kératinocytes ou les cellules dendritiques. Suite à cela, ces interleukines induisent l'expression de CA2 (carbonic anhydrase 2) et NELL2 (neural EGFL like 2). CA2 est une protéine jouant un rôle sur l'homéostasie du pH. En effet, dans la DA, le pH est augmenté et CA2 est produit en grande quantité dans le but d'augmenter l'acidification de la peau. NELL2 joue un rôle dans le prurit en augmentant le nombre de fibres nerveuses au niveau du derme (Bogiatzi *et al.*, 2007; Kamsteeg *et al.*, 2011; Kamsteeg *et al.*, 2007; Ohtani *et al.*, 2009).

Il a été également rapporté que les IL-4 et -13 induit l'apoptose des kératinocytes par l'augmentation de l'expression de FAS-L. Une fois lié à son récepteur, ce ligand active la caspase 8 ou 10 qui elle-même active la caspase 3, protéine jouant un rôle dans la mort cellulaire par la fragmentation de l'ADN. En plus d'être sous-exprimée par mutations génétiques, la FLG l'est également par ces interleukines ainsi que par l'IL-25. Cette dernière promeut la polarisation des lymphocytes Th2. De même, une diminution d'IL-8 et des peptides antimicrobiens est rapportée. De plus, les IL-4 et -13 inhibent la synthèse de céramides altérant ainsi l'enveloppe cornée (Bogiatzi *et al.*, 2007; De Benedetto *et al.*, 2009; De Vuyst *et al.*, 2016b; Kamsteeg *et al.*, 2011).

L'environnement

Les personnes prédisposées à développer la DA, seront atteintes de celle-ci suite à l'exposition à un ou plusieurs facteurs environnementaux. Ces facteurs comprennent la cigarette, le régime alimentaire riche en méthyl, le microbiote peu présent ou encore l'exposition à des polluants et des allergènes aériens et alimentaires. Parmi ces facteurs, certains induisent également des modifications épigénétiques sur des gènes responsables de la formation de la barrière épidermique et de la réponse immune (Hussein *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2016).

Par exemple, les promoteurs du gène de FOXP3 (forkhead box P3), facteur de transcription du gène de Treg (lymphocyte T régulateur), ou du gène de l'IFN γ qui induit une polarisation de lymphocytes T en Th1, sont hyperméthylés. Cela inhibe la transcription de ces gènes. À l'inverse, le promoteur des gènes codant pour Fc ϵ RI, récepteur à grande affinité des IgE, et pour TLSP sont hypométhylés permettant la transcription de ces gènes. De plus les miARN (micro ARN) induisent également une inhibition de la transcription de gènes. Les miARN sont de petits ARN non codant qui se lient sur l'ARNm dans le but de le dégrader ou d'empêcher sa traduction en protéines (Hamam *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2016)

De plus, le style de vie des pays industrialisés augmente le risque de développer la DA. Premièrement, le stress augmente la production de glucocorticoïdes ce qui va inhiber la production de lipides. Ensuite, le fait de se laver tous les jours au savon augmente le pH de la peau à un pH neutre au lieu d'acide. Ce pH est optimal pour la survie de microbes tels que le *S. aureus* qui sécrète des protéases détruisant la barrière épidermique et des toxines dans le but d'activer les lymphocytes T en jouant le rôle de superantigènes. Les acariens jouent également un rôle dans la maladie par sécrétion de protéases à sérines et cystéines (De Benedetto *et al.*, 2009; Elias and Steinhoff, 2008; Hussein *et al.*, 2011; Kamsteeg *et al.*, 2007; Simon and Bieber, 2014).

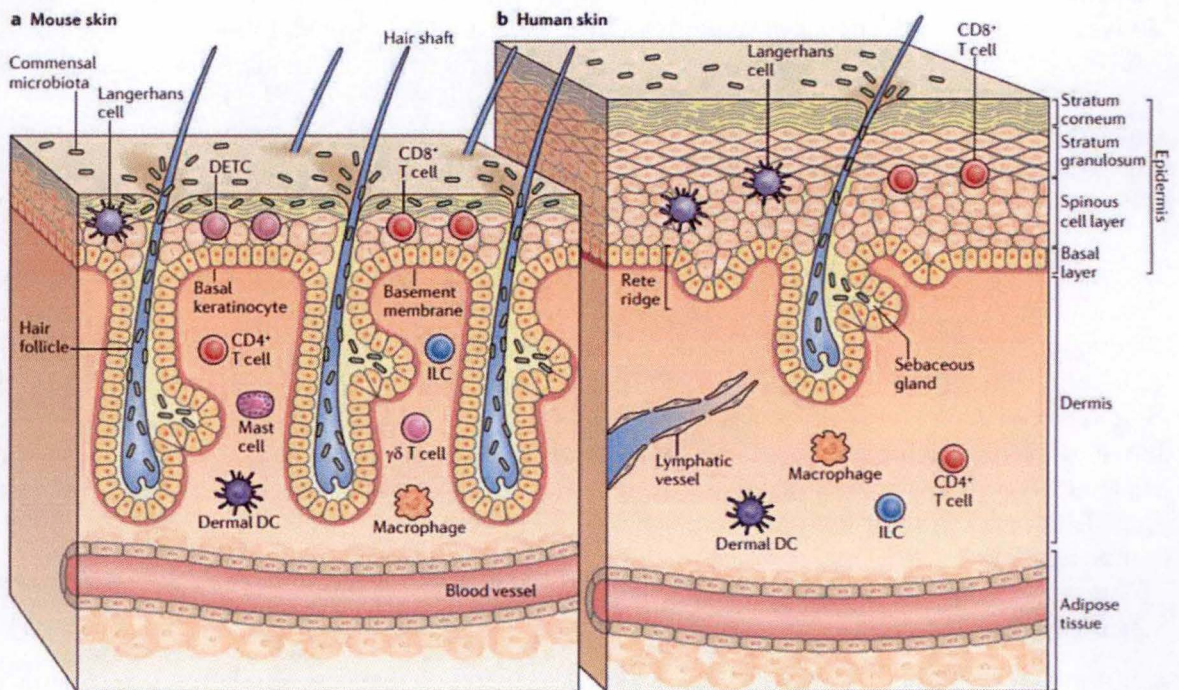
Les traitements

Les traitements contre la DA ont pour but de réparer la barrière épidermique, d'inhiber l'inflammation, d'empêcher l'infection (Leung, 2013).

Au niveau de la réparation de la barrière, une bonne hydratation de la peau est importante via des crèmes hydratantes. Ces crèmes peuvent également contenir des céramides ou de la filaggrine. Ensuite, l'inflammation est réduite par des inhibiteurs de calcineurine et des stéroïdes qui sont des agents anti-inflammatoires. Ces traitements permettent également de récupérer une prolifération et une différenciation normales des kératinocytes (Boguniewicz and Leung, 2011; Jensen *et al.*, 2009; Leung, 2013).

La vitamine D participe à la régulation de la production de peptides antimicrobiens ce qui permet de détruire les pathogènes. Les scientifiques ont donc testé la vitamine D comme thérapie contre la DA. Les résultats semblent concluants même si d'autres études doivent encore être réalisées. À l'instar de la vitamine D, d'autres thérapies doivent être encore approuvées pour être utilisées sur des patients atteints de DA. Ces traitements prennent en compte les anticorps dirigés contre les cytokines ou les médiateurs de cette maladie (Boguniewicz and Leung, 2011; Hata *et al.*, 2008; Sidbury *et al.*, 2008; Simon and Bieber, 2014).

Les antibiotiques sont également utilisés dans le but de détruire les pathogènes présents tels que le *s.aureus* présent chez 90% des patients. Ce traitement est à utiliser avec précaution car comme mentionné plus haut, le microbiote présent sur la peau sera également détruit (Simon and Bieber, 2014).



Pasparakis et al. 2014

Figure 15: schéma de la peau de souris (A) comparé à celui de la peau humaine (B).

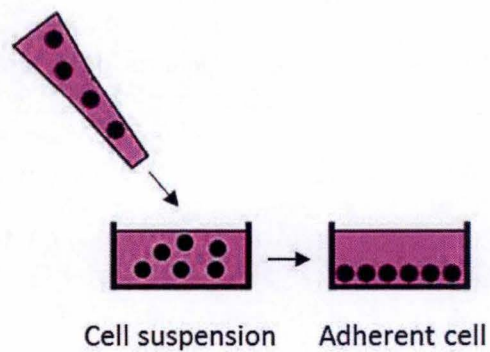


Figure 16: modèle en deux dimensions : monocouche

Modèle de la dermatite atopique

La DA est investiguée grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*. À ce jour, plusieurs modèles sont utilisés ayant chacun des avantages et des inconvénients. Le choix du modèle est donc fonction de l'élément à étudier. Il est important de toujours être critique lors de l'analyse des résultats car ceux-ci peuvent ne pas être extrapolable à l'humain.

Modèles *in vivo*

Malgré que les chiens et les cochons d'inde induisent spontanément des lésions de DA, le modèle *in vivo* utilisé est la souris car celle-ci est plus facilement manipulable. La DA est induite chez ces rongeurs en les modifiant génétiquement ou en leur administrant des molécules telles que des allergènes par gavage ou par lésions de la peau, produisant ainsi une sensibilisation épicutanée. Certaines souches de souris induisent spontanément cette maladie sous certaines conditions telles que l'exposition aux allergènes aériens. Néanmoins, la peau de souris présente de nombreuses différences avec la peau humaine (Voir figure 15). L'extrapolation n'est donc pas évidente. En effet, l'épiderme de souris se renouvelant après 8 à 10 jours au lieu de 28 jours, contient seulement 6 à 7 couches de kératinocytes contrairement à celui de l'humain qui en contient 16 à 18 couches. De plus, la peau de souris présente plus de follicules pileux mais ne présente aucune glande sébacée ni de mélanocytes. Deux types cellulaires de l'immunité adaptative sont présents chez la souris mais pas chez l'humain. Ce sont les cellules $T\gamma\delta$ et les DETC (dendritic epidermal T cell) (De Vuyst *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2009; Pasparakis *et al.*, 2014).

De plus, pour des raisons éthiques, la commission européenne a interdit tout test de produits cosmétiques sur animaux, sauf exception. Cela a permis le développement de nombreuses méthodes alternatives par les modèles *in-vitro* répondant au principe des 3Rs (De Vuyst *et al.*, 2017; Poumay and Coquette, 2007).

Modèles *in vitro*

Deux grands types de modèles *in vitro* existent, le modèle à 2 dimensions et celui à trois dimensions. Le modèle à deux dimensions ou modèle en monocouche (voir figure 16) est un modèle qui utilise un type cellulaire ou qui permet une co-culture de deux types cellulaires pour observer l'interaction entre les deux. Ce modèle est simple à réaliser et l'interprétation des résultats est plus facile. Toutefois, ce modèle, fort simplifié, ne permet pas d'observer les caractéristiques des kératinocytes dans les différentes couches de l'épiderme et donc d'étudier la barrière épidermique altérée dans la DA. De ce fait, des modèles plus complexes mais plus proches de la réalité ont été produits (De Vuyst *et al.*, 2017; Georgantzopoulou *et al.*, 2016).

Les modèles d'épiderme à trois dimensions permettent d'obtenir les quatre couches de l'épiderme à partir de culture kératinocytes. À partir de ce modèle, des cellules contenues dans la peau peuvent être ajoutées dans le but d'observer les interactions cellulaires. De plus, afin de réaliser un modèle de la DA, les kératinocytes peuvent soit être modifiés génétiquement en diminuant ou augmentant l'expression d'un gène cible de cette maladie soit provenir de patients malades. Deux types de modèles à trois dimensions ont été créés jusqu'à maintenant, les HSE (human skin equivalent) et les RHE (reconstructed human epidermis). Le HSE est une peau reconstruite contenant le derme et l'épiderme. Ceci est basé sur le principe de reconstruction de tissus où les cellules sont reposées sur une base qui est soit un gel soit un échafaudage. Le RHE, modèle utilisé dans ce mémoire, est décrit plus en détails dans le paragraphe suivant (Auger *et al.*, 2004; De Vuyst *et al.*, 2017).

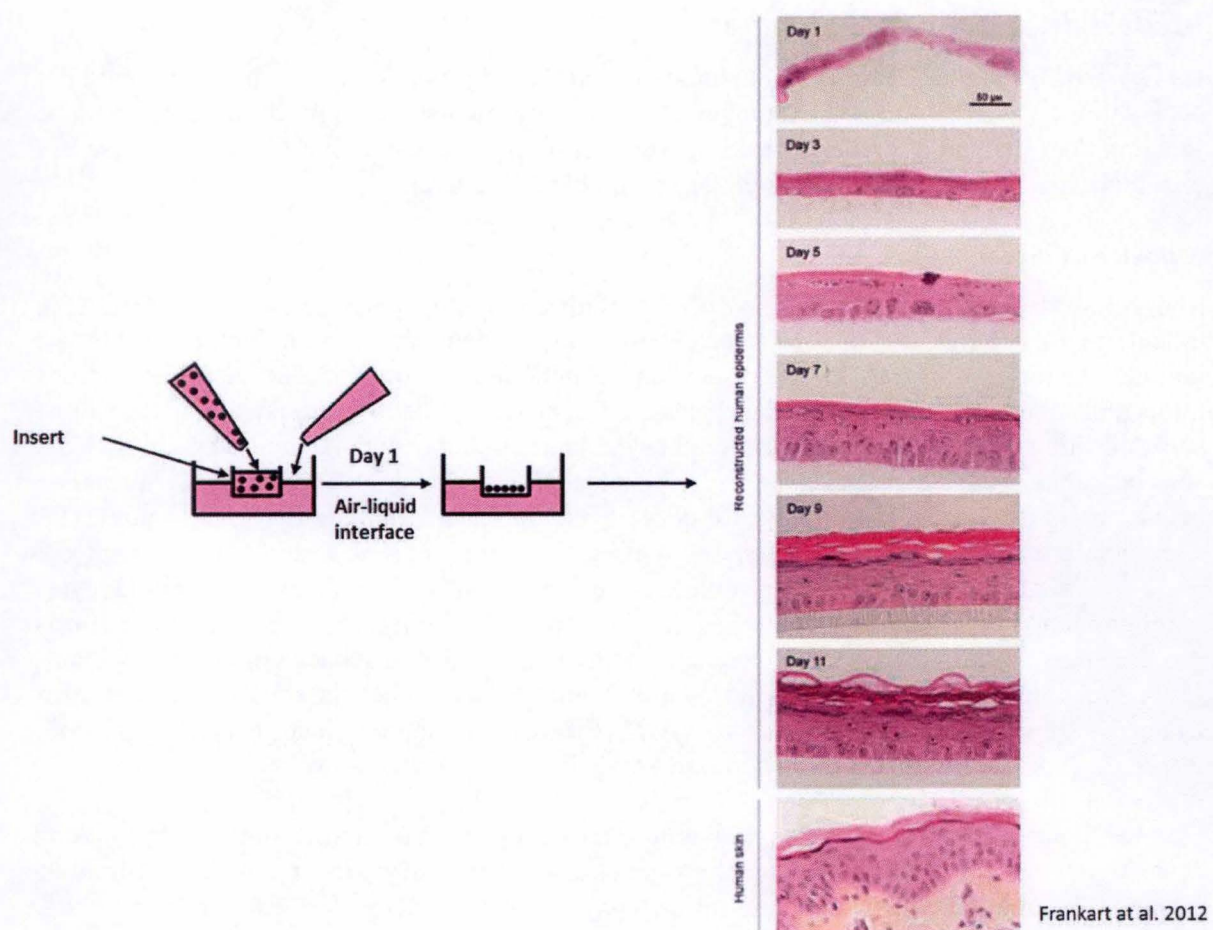


Figure 17: modèle en trois dimensions : RHE

Le RHE (Voir figure 17) est un épiderme reconstruit par interface air-liquide. En effet, des kératinocytes sont ensemencés sur un filtre en polycarbonate dont l'insert se trouve dans un puit rempli de milieu de culture. À J+1, les kératinocytes sont mis en interface air-liquide pendant 11 jours dans le but de mimer des conditions réelles. Cette exposition à l'air induit la différenciation des kératinocytes et leur donne un haut pouvoir prolifératif également retrouvé au niveau des kératinocytes d'une peau lésée. Cette capacité à proliférer disparaît au fur et à mesure qu'une barrière épidermique se forme commençant à J+5, moment où les granules de keratohyalines sont synthétisés par les kératinocytes. À J+9, la prolifération de la couche basale diminue de manière significative suggérant la formation de la couche cornée qui est confirmée par l'augmentation de la résistance électrique transépithéliale et la diminution de perméabilité à la lucifer yellow. En effet la lucifer yellow est un fluorochrome vert hydrophile. La couche cornée hydrophobe, grâce à la présence de lipides, empêche donc ce fluorochrome de traverser l'épiderme reconstruit. Enfin à J+11, un épiderme reconstruit fonctionnel est obtenu, évalué par la présence de marqueurs de différenciation, c'est-à-dire la présence de la kératine 14 au niveau de la couche basale, de la kératine 10 dans les couches supra-basales et de la loricrine et de l'involucrine au niveau des couches granuleuse et cornée (De Vuyst *et al.*, 2015; De Vuyst *et al.*, 2016a; De Vuyst *et al.*, 2017; Eckhart *et al.*, 2013; Frankart *et al.*, 2012b; Poumay and Coquette, 2007; Poumay *et al.*, 2004).

Suite au *microarray* réalisé sur les kératinocytes déplétés en cholestérol, Evelyne De Vuyst et ses collègues ont réalisé un modèle de DA à partir de RHE. Les RHE à J+5 ont été traités par la M β CD 7,5 mM pendant 1 heure au moment où la barrière commence à se former. La M β CD est diluée dans le milieu de culture se trouvant dans le puit. Après traitement, une diminution du cholestérol est rapportée et les kératinocytes sont capables d'en resynthétiser après 4h de récupération. La M β CD, étant une molécule hydrophile, ne passe pas la barrière hydrophobe de la couche cornée qui est aidée par les jonctions serrées présentes dans la couche granuleuse. Cela empêche donc la perte de cholestérol dans la couche cornée. Dans ce modèle, une activation des voies de signalisation et une augmentation de l'expression relative en ARNm de gènes surexprimés dans la DA sont observées entre 1 et 8h de récupération. Malheureusement aucune différence dans la morphologie et l'altération de la barrière n'est retrouvée entre les RHE contrôles et ceux traités (De Vuyst *et al.*, 2015).

De ce fait, des changements ont été réalisés dans le protocole. En effet, les RHE sont traités à J+11 par la M β CD 7,5 mM pendant deux heures. Ils sont ensuite traités pendant 48h par des interleukines responsables de la DA tels que les IL-4, 13 et 25. De plus, des RHE traités pendant 48h seulement par ces interleukines servent de contrôle. Dans ce modèle, une altération de la barrière et de la morphologie telle que la spongiose et l'hypogranulose est observée dans les RHE traités par les interleukines et cette altération est augmentée dans les RHE subissant les deux traitements. Par ailleurs, une augmentation relative de l'expression en ARNm de CA2 et NELL2 et une diminution relative de l'expression en ARNm de la FLG et de la LOR sont rapportées dans les RHE traités par les interleukines avec ou sans traitement par la M β CD. Tous ces événements sont également retrouvés au niveau de peaux lésionnelles de DA. De plus, le fait que les réponses aux interleukines sont augmentées si les épidermes reconstruits ont d'abord été traités par la M β CD suggère que les récepteurs à ces interleukines sont régulés par les microdomaines lipidiques (De Vuyst *et al.*, 2016a).

Par ailleurs, les effets sur les RHE des différentes cytokines séparément ont été étudiés. Il est rapporté que l'IL-4 induit une plus grande réponse au niveau de l'altération de la barrière et de la morphologie, ainsi que dans la régulation de l'expression de gènes. Cela étant, l'IL-13

joue également un rôle, même si cela semble plus mineur. Enfin l'IL-25 induit notamment une diminution de l'expression de la FLG (do Nascimento Pedrosa *et al.*, 2017).

Objectif

Suite aux travaux d'Evelyn De Vuyst et de Conny Mathay, l'hypothèse selon laquelle les récepteurs aux interleukines 4 et 13 sont régulés par les microdomaines lipidiques est avancée. En effet, comme mentionné plus haut, lors de traitement par la M β CD, les réponses à ces interleukines sont plus importantes. De plus, il a été rapporté que ces récepteurs sont surexprimés dans les kératinocytes déplétés en cholestérol par rapport aux cellules contrôles. De ce fait, l'objectif de mon mémoire, qui fait suite au mémoire de Maureen Bourtembourg, est d'étudier la régulation des récepteurs aux interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les kératinocytes humains.

Pour ce faire, deux modèles sont utilisés, les cultures de kératinocytes en monocouche et les RHE. Les kératinocytes en monocouche au stade de confluence, ou les RHE à J+11 sont traités par la M β CD 7,5 mM pendant deux heures et analysés après différents timings de récupération après le traitement. Ceci a pour objectif de visualiser l'effet, sur ces récepteurs, d'une déplétion en cholestérol de la membrane plasmique et donc d'une désorganisation des microdomaines lipidiques. Ensuite, ces modèles sont traités par les interleukines 4, 13 et 25, après traitement ou non par la M β CD, dans le but d'étudier les réponses cellulaires à ces interleukines.

Dans ce mémoire, ces récepteurs sont étudiés dans un modèle en monocouche et en RHE. En effet l'expression relative en ARNm et en protéines de ces récepteurs est investiguée dans les kératinocytes ou les RHE déplétés en cholestérol et traités par les interleukines. Ensuite la signalisation induite par ces récepteurs est analysée. De plus, la localisation des sous-unités de ces récepteurs est explorée dans ces deux modèles. Par ailleurs, grâce à la sonde lysénine, la localisation de ces récepteurs dans les microdomaines lipidique est étudiée.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Tableau 1 : Matériels et produits utilisés lors de la culture des kératinocytes

Matériels

Filtre en nylon 70µm	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Falcon 50mL	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cellule de Thoma	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Allemagne
Boîtes T175	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cryotube	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Boîte de 9,6 cm ²	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Plaque 6 puits	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Plaque 24 puits	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Lamelles	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Insert	Merck, Darmstadt, Allemagne
Centrifugeuse Allegra-x-15R centrifuge	Beckman Coulter, Brea, Californie, États-Unis
Incubateur	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Produits

Solution A pH 7.4	
- Glucose 10.0 mM	Merck, Darmstadt, Allemagne
- KCL 3.0mM	Merck, Darmstadt, Allemagne
- NaCl 130.0 mM	VWR International, Leuven, Belgique
- Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O 1.0 mM	VWR International, Leuven, Belgique
- Phenol red 0.0033 mM	Merck, Darmstadt, Allemagne
- Hepes 30.0mM	VWR International, Leuven, Belgique
KGM (Keratinocyte Growth Medium)-2	
- KBM (Keratinocyte Basal Medium)-2 (calcium 0,15 mM)	Lonza, Bâle, Suisse
- BPE (Bovin Pituitary Extract) 50µg/ml	Clonenetics, Verviers, Belgique
- EGF (epithelial growth factor) 10ng/ml	Clonenetics, Verviers, Belgique
- Insuline 5µg/ml	Clonenetics, Verviers, Belgique
- Hydrocortisone 5*10 ⁻⁷ M	Clonenetics, Verviers, Belgique
- Transferrine 5µg/ml	Clonenetics, Verviers, Belgique
- Fungizone 250µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Ampicilline 250µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Trypsine T17	
- Tripsine 0,17%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Solution A	
HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement)	
- BPE 0.2%	Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
- EGF 0.2 ng/ml	Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
- Hydrocortisone 0.18µg/ml	Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
- Insuline 5µg/ml	Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
- Transferrine 5µg/ml	Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
Epilife® complet	
- Epilife® (calcium 0,06 mM)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- HKGS	Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
- Pénicilline 50 U/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Streptomycine 50µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
dFCS (dialyzed fetal calf serum)	Clonenetics, Verviers, Belgique

Culture (Tableau 1)

Culture primaire des kératinocytes humains

Les kératinocytes proviennent d'abdominoplastie réalisée sur des patients sains par le Dr Bienfait (Clinique St Luc, Namur-Bouge, Belgique). Les patients sont informés et consentants et cette chirurgie est approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital St Luc. Après avoir prélevé la couche superficielle de la peau excédentaire à l'aide d'un dermatome, l'épiderme et une partie du derme sont récupérés et conservés dans une solution physiologique à 4°C. La peau sectionnée est découpée en carrés de 1 à 2 cm² et incubée à 4°C *overnight* dans 8 ml de trypsine T17 contenant de l'ampicilline, de la gentamycine et du fungizone. La trypsine est une endopeptidase qui clive les liens peptidiques entre la lysine et l'arginine ce qui permet de digérer les protéines responsables de l'adhésion entre le derme et l'épiderme. De plus, de l'EDTA est ajouté à la trypsine car il s'agit d'un chélateur des ions Ca²⁺, ce qui inhibe l'adhésion intercellulaire qui dépend de la présence de cet ion. L'épiderme est séparé du derme à l'aide de pinces et placé dans une boîte de pétri contenant du KGM-2-dFCS2% pour inhiber l'effet de la trypsine. Les kératinocytes sont détachés mécaniquement à l'aide de pinces et de « *up and down* » avec une pipette. Le tout est ensuite placé sur un filtre en nylon de 70 µm surmontant un tube Falcon de 50 ml. La boîte de pétri est rincée avec 10 ml de KGM-2-dFCS2% également déposé sur le filtre. Le tube Falcon est centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes pour retirer les gros débris de l'épiderme. Le surnageant est enlevé et le culot resuspendu dans 10 ml de KGM-2 pour compter les cellules.

5 µl de cellules resuspendues dans 5 µl de bleu de trypan sont analysés grâce à une cellule de Thoma. Le bleu de trypan, pénétrant la membrane perméable des cellules mortes, permet de les distinguer des cellules vivantes en les colorant en bleu. Les cellules sont comptées sur un carré de 1 mm². La quantité de cellules présentes dans les 10 ml de KGM-2 est estimée par la formule suivante : le nombre de cellules comptées X 2 (dilution 2X) X 10 (10 ml) X 10000 (0,1 mm³ = 10⁻⁴ ml). Les cellules sontensemencées à une densité de 46000 cellules/cm² dans des flasques T175 contenant 25 ml de KGM-2-dFCS0,1%. Le KGM-2 facilite l'adhésion cellulaire grâce à une concentration en Ca²⁺ supérieure au milieu complet Epilife® et grâce au dFCS, la prolifération. Les cellules sont placées à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant trois jours. Il est important de ne pas bouger les boîtes pendant ce temps. Le milieu est ensuite changé tous les deux jours avec du milieu complet Epilife®.

Passage des kératinocytes en culture

À 50-60% de confluence, les cellules sont trypsinisées. Cette méthode permet aux cellules de garder leur pouvoir prolifératif qu'elles perdent lorsque la densité atteint la confluence. Le milieu de culture est remplacé par 8 ml de trypsine T25 pour détacher les cellules de la flasque. Après 10 minutes d'incubation, une partie de la trypsine est enlevée, en laissant un fin film de liquide, pour d'abord enlever les fibroblastes et les mélanocytes (qui se détachent plus vite que les kératinocytes). Après 30 minutes d'incubation, toutes les cellules sont détachées et la trypsine résiduelle est inhibée par 10 ml de solution A à 4°C contenant le dFCS à 2%. Les cellules sont transférées dans un tube Falcon de 50 ml et la flasque T175 est rincée par 10 ml de solution A-dFCS2%, également transférée dans le tube Falcon. Celui-ci est centrifugé à 200 g à 4°C pendant 10 minutes pour concentrer les kératinocytes en un culot qui est resuspendu dans 10 ml de milieu complet Epilife®.

Les cellules sont comptées avec le bleu de trypan dans la cellule de Thoma. Les cellules sontensemencées à une densité approximative de 10 000 cellules/cm² dans des flasques T175

Produits

Bleu de trypan

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Trypsine T25

- Trypsine 0,025%

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

- EDTA (Ethylène Diamine Tétracétate) 0.01%

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

- Solution A

Solution de congélation

- *Epilife® complet*

- DMSO (Diméthylsulfoxyde) 20%

Merck, Darmstadt, Allemagne

- dFCS 20%

Clonetics, Verviers, Belgique

Milieu de culture pour RHE

- *Epilife® complet*

- CaCl_2 1.44 mM

R&D system, Minneapolis, USA

- KGF (keratinocytes growth factor) 10ng/ml

R&D system, Minneapolis, USA

- Vitamine C 50µg/ml

R&D system, Minneapolis, USA

contenant 25 ml de milieu complet Epilife®. Les cellules sont placées à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est changé tous les deux jours.

Cryopréservation des kératinocytes

Après 60% de confluence les cellules sont trypsinisées comme décrit ci-dessus, réensemencées dans la solution de congélation à une densité de 2 millions de cellules/ml. 1 ml est déposé dans un cryotube de 1,5 ml annoté NAK (normal abdominoplasty keratinocytes) plus le numéro de la souche. Le cryotube est placé à -80°C pendant 24h et ensuite dans de l'azote liquide à -180°C.

Culture secondaire des kératinocytes

Les kératinocytes sont décongelés rapidement à 37°C. Une fois décongelés, il faut immédiatement les mettre sur glace. Les kératinocytes doivent rester continuellement à 4°C pour qu'ils ne s'agrègent pas. Les cellules sontensemencées dans une flasque T175 contenant 25 ml de KGM-2. Les cellules sont mises dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ *overnight*. Ensuite le KGM-2 est remplacé par du milieu complet Epilife® chauffé préalablement à 37°C pour éviter un éventuel choc thermique. Les cellules sont placées dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu de culture est par la suite changé tous les deux jours.

À 70-80% de sous-confluence, les kératinocytes sont trypsinisés par le même protocole décrit ci-dessus en dehors du fait que les cellules sont incubées dans la trypsine pendant 7 minutes et donc qu'une partie de la trypsine est enlevée après 2 minutes. Les cellules sont transférées dans un eppendorf, centrifugées à 12 000 rpm à 4°C pendant 5 minutes et le culot est resuspendu dans 2 ml de milieu complet Epilife®. Les cellules sont comptées avec le bleu de trypan dans la cellule de Thoma.

Monocouche de kératinocytes

La quantité adéquate de cellules est mise en suspension dans un volume adéquat de milieu complet Epilife® pour les ensemer dans des boîtes de 9,6 cm² ou puits de 1,9 cm² à raison de 9 000 cellules/cm². Pour cultiver les kératinocytes sur lame couvre-objet de 0,15 mm, celles-ci sont déposées au fond des puits de la vaisselle de culture avant d'y ensemer les kératinocytes. Les cultures sont incubées à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu est changé tous les deux jours.

Epiderme humain reconstruit (RHE)

Les inserts contenant un filtre de polycarbonate (surface : 0,63 cm², taille des pores : 0,4µm) sont déposés dans des plaques 6 puits. 150 000 à 170 000 cellules sont ensemer dans l'insert et 2,5 ml de milieu complet Epilife® contenant du CaCl₂ 1,44 mM sont ajoutés dans le puit. Du CaCl₂ est également ajouté aux cellules pour que celles-ci adhèrent entre elle et au filtre. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les cellules sont exposées à l'interface air-liquide en aspirant le milieu contenu dans les inserts, ce qui permet la différenciation des kératinocytes (Frankart *et al.*, 2012b). Le milieu contenu dans les puits est remplacé par 1,5 ml de milieu de culture pour RHE. Les RHE sont placés à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est changé tous les deux jours. Après 11 jours de culture, des épidermes fonctionnels sont reconstruits et sont prêts à être traités.

Tableau 2 : Matériels et produits utilisés lors du traitement de monocouche de kératinocytes ou RHE

Matériels	
Filtre 0,2µm	Merck, Darmstadt, Allemagne
Cuvette	Lonza, Bâle, Suisse
Falcon 50 ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Boîtes 9,6 cm²	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Plaque 24 puits	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Lamelle	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Incubateur	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Centrifugeuse	Beckman Coulter, Indianapolis, USA
Machine d'électroporation	Lonza, Bâle, Suisse
Produits	
Epilife® de croissance autocrine	
- Epilife®	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- L-histidine 0.24 mM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- L-isoleucine 0.75 mM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- L-méthionine 0.9 mM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- L-phénylalanine 0.9 mM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- L-tryptophane 0.45mM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Pénicilline 50 U/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Streptomycine 50µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
MβCD (methyl-β-cyclodextrin)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Solution A	
Milieu de culture pour RHE (reconstructed human epidermis)	
IL-4	PreproTech, New Jersey, USA
IL-13	PreproTech, New Jersey, USA
IL-25	PreproTech, New Jersey, USA
Tampon électrophorèse	Lonza, Bâle, Suisse
Epilife® complet	

Tableau 3 : siRNA utilisés lors de l'électroporation

ARNm cible	Séquence	Référence	Firme
IL-4Rα (SMART pool)	-GUCAACAUUUGGAGUGAAA -GAAUCUAUAACGUGACUUA -CUUCAAGCCCAGCGAGCAU -ACGUGGUCAGUGCGGAUAA	M-007990-01-0005	Dharmacon, Colorado, États-Unis
NT (non-target) 1	UAGCGACUAAACACAUCAA	D-001210-01-05	Dharmacon, Colorado, États-Unis
NT 2	AUGUAUUGGCCUGUAUUAG	D-001810-03-05	Dharmacon, Colorado, États-Unis

Traitement (Tableau 2)

Méthyl- β -cyclodextrine

Monocouche de kératinocytes

À 80-90% de confluence, le milieu complet Epilife® est remplacé par du milieu de culture autocrine. Les cellules sont placées dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est changé tous les deux jours. À confluence, les cellules sont traitées par une solution 7,5 mM de M β CD diluée dans le milieu de culture autocrine. Après 30 minutes de solubilisation, la solution est filtrée et les cellules sont traitées par la M β CD pendant 2 heures à 37°C. Après cela, les cellules sont rincées à la solution A et incubées à 37°C et 5% de CO₂ dans le milieu de culture autocrine. Le milieu est changé tous les deux jours. Après chaque temps de récupération, le milieu est enlevé et les cellules sont congelées à -80°C ou fixées au PBS-PFA4%.

RHE

Le protocole est le même que pour les cultures en monocouche en dehors du fait que le traitement se fait après 11 jours de culture et que la M β CD 7,5mM est diluée dans le milieu de culture pour RHE. Après traitement et différentes durées de récupération, le milieu de culture est récupéré et congelé à -20°C. Les RHE sont immédiatement congelés à -80°C ou fixés au formol acétique.

Interleukines

Monocouche de kératinocytes

À 80-90% de confluence, le milieu complet Epilife® est remplacé par du milieu de culture autocrine. Les cellules sont placées dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est changé tous les deux jours. À confluence, les cellules sont traitées par les interleukines IL-4, IL-13 et IL-25 diluées dans le milieu de culture autocrine à des concentrations respectives de 50 ng/ml, 50 ng/ml et 20 ng/ml. Ensuite les cellules sont placées dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et après les temps d'incubation adéquats, le milieu est aspiré et les cellules sont congelées à -80°C ou fixées dans le PBS-PFA4%.

RHE

Le protocole est le même que pour les cultures en monocouche en dehors du fait que le traitement est réalisé après 11 jours de culture. L'IL-4, l'IL-13 et l'IL-25 sont diluées dans le milieu de culture pour RHE. Le milieu de culture est récupéré et congelé à -20°C. Les RHE sont congelés à -80°C ou fixés au formol acétique.

Electroporation

Après trypsinisation et comptage des cellules, un volume adéquat de milieu complet Epilife® contenant les cellules est transféré dans un tube Eppendorf centrifugé à 1200 rpm à 4°C pendant 5 minutes pour récupérer 600 000 à 700 000 cellules. Le surnageant est enlevé et le culot est dilué dans 100 μ l de tampon d'électrophorèse contenant 2,5 μ g de siARN (tableau 3). Pour le contrôle, le tampon d'électrophorèse ne contient pas de siARN. Les cellules sont transférées dans une cuvette qui sera placée dans le Nucleofector™ 2b Device sur le programme T-24 permettant une haute efficacité de transfection. Après cela, les cellules sont laissées au repos pendant 15 minutes dans 500 μ l de milieu complet Epilife®. Le contenu de la cuvette est transféré dans un tube Falcon contenant un volume adéquat de milieu pour ensemer les

Tableau 4 : Matériels et produits utilisés lors de l'analyse de l'expression relative en ARNm

Matériels	
Mini râteau	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
plaque 12 puits	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Plaque 96 puits	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Hambourg, Allemagne
NanoDrop 1,000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
LightCycler 96	Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgique
Produits	
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgique
MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Kit	Qiagen, Hilden, Allemagne
SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase Kit	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Rox sybr Master blue dTTP	Eurogentec, Liège, Belgique
TaqMan Gene expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

cellules dans des boîtes de 9,6 cm² ou des puits de 1,9 cm² contenant des lamelles de 0,15 mm pour un marquage ultérieur des cellules. Les kératinocytes sont placés dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est d'abord changé après 24h, puis ensuite tous les deux jours. Après chaque temps de récupération, le milieu est aspiré et les cellules sont congelées à -80°C ou fixées au PBS-PFA4%.

Analyse de l'expression relative en ARNm des gènes d'intérêt (Tableau 4)

Principe

La RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction) permet notamment d'analyser une expression relative d'un gène d'intérêt. L'ARNm isolé par des oligoDT est rétro-transcrit en ADNc qui va être ensuite amplifié par une PCR de 42 cycles. Un cycle de PCR consiste à dissocier les fragments d'ADN à une température de 95°C, hybrider les primers à 68°C ou la sonde TaqMan à 72°C et à polymériser à 72°C. Après chaque cycle, la fluorescence du SYBRgreen ou TaqMan est calculée. Le Cq d'un gène est alors obtenu. Le Cq est le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne un seuil défini, correspondant au cycle de la réaction où l'amplification exponentielle est détectée. Pour cette manipulation, il est obligatoire de travailler en zone *RNase-free* en portant des gants *RNase-free* pour éviter que les RNase présentes sur les mains dégradent l'ARN.

Extraction

Monocouche de kératinocytes

L'extraction nucléique est réalisée par le kit « High Pure RNA Isolation Kit » selon les recommandations du fabricant. L'ARN est conservé sur glace et dosé directement ou stocké à une température de -80°C.

RHE

L'extraction nucléique est réalisée par le kit « MACHEREY-NAGEL NucleoSpin » selon les recommandations du fabricant. L'ARN est conservé sur glace et dosé immédiatement ou stocké à -80°C.

Dosage

L'ARN est dosé par le NanoDrop 1,000 spectrophotometer. Une goutte de 1,5 µl d'ARN est déposée sur la tête de lecture qui va calculer l'absorbance à 260 nm pour en connaître la concentration. La pureté de l'échantillon est également analysée en mesurant l'absorbance des protéines (280nm) et des sels (230nm). Le rapport des absorbances 260/280 et des absorbances 260/230 doit produire une valeur proche de 2 pour estimer qu'il n'y a pas de contamination.

Reverse transcription

L'extraction se fait par le kit « SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase ». Les échantillons sont décongelés et dilués dans de l'eau *RNase-free* pour obtenir 1 µg d'ARN dans 11 µl de solution. À ces 11 µl, 1 µl de dNTP (désoxynucléotide triphosphate) 10 mM et 1 µl d'oligoDT 0,5 µg/ml sont rajoutés. Les échantillons sont chauffés à 65°C pendant 5 minutes pour permettre la liaison des oligoDT à la queue polyA des ARNm. Ensuite, 4 µl de 5X First Strand Buffer (Tris HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2µl de DTT (dithiotréitol) 0,1 M et 1 µl de SuperScript III RNase H reverse transcriptase 200 U/µl sont rajoutés à l'échantillon chauffé à 50°C pendant 50 minutes et puis à 70°C pendant 15 minutes pour inhiber la RT.

Tableau 5: Primers utilisés lors de la RT-qPCR en SYBRgreen

Gène d'intérêt	Primer Forward	Primer Reverse	Firme
RPLP0	ATC AAC GGG TAC AAA CGA GTC	CCT TCT TGG CTG ATC CAT CTG	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
IL-13R α 1	ACC CGA GGG AGC CAG CTC A	GTG GGG TCC CAG TGT AGC ACC	Eurogentec, Liège, Belgique
IL-13R α 2	ATA CCT TTG GGA CCT ATT CC	ACT TGT AAA CCG GTA CTG AC	Eurogentec, Liège, Belgique
IL-2R γ	GCA GAA ACG CTA CAC GTT TCG	GTG GAT TGG GTG GCT CCA T	Eurogentec, Liège, Belgique
Loricrin	TCA TGA TGC TAC CCG AGG TTT G	GTC TTG ATC TAC GTC GGC CTC T	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Filaggrin	GGG CAC TGA AAG GCA AAA AG	GTG GTA TTA GTA TTA GAC GTG ATG GT	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Carbonic Anhydrase 2	AAC AAT GGT CAT GCT TTC AAC G	ACA GGT AGT TCA CTT GGG GTC	Eurogentec, Liège, Belgique
Neural Epidermal Growth Factor like 2	TAA GGG TAT AAT GCA AGA TGT CCA ATT	TCT AGA CCC GTG ACT CGT TAT TT	Eurogentec, Liège, Belgique
IL-8	GCA GAG GGT TGT GGA GAA GTT T	AAC CTA TGG TGT CTC TTA CTT AAA AA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
HB-EGF	TGG CCC TCC ACT CCT CAT C	AGC TAG GAT GGT TCT GTG ACC C	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Tableau 6: Primers et sondes utilisés lors de la RT-qPCR en TaqMan

Gène d'intérêt	Reference	Firme
RPLP0	HS 00965056-m1	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
IL-4R α	HS 00420895	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

L'ADNc est dilué 25X ou 5X pour avoir respectivement une concentration de 2 ng/μl (SYBRgreen) ou de 10 ng/μl (TaqMan) et conservé à -20°C.

qPCR

SYBRgreen

Un mélange est réalisé à raison de 10 μl de SYBRgreen, 2,5 μl de primers antisens et 2,5 μl de primers sens (tableau 5) par échantillon. 15 μl de ce mélange sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. À ces 15 μl, 5 μl de l'ADNc 2 ng/μl sont rajoutés. Une fois la plaque terminée et centrifugée 3 minutes à 1200 rpm, elle est placée dans le LightCycler 96 pour amplifier l'ADNc.

TaqMan

Un mélange est réalisé à raison d'1 μl de *TaqMan Gene expression assay* contenant la sonde et les primers (tableau 6), 10 μl de *TaqMan Gene expression master mix* et 5 μl d'eau *RNase-free* par échantillon. 16 μl de ce mélange sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. À cela sont ajoutés 4 μl d'ADNc 10 ng/μl. Une fois la plaque terminée et centrifugée 3 minutes à 1200 rpm, elle est placée dans le LightCycler 96 pour amplifier l'ADNc.

Interprétation

Les Cq des échantillons sont rendus interprétables en 3 étapes : normaliser, relativiser et rendre biologiquement interprétable. Normaliser consiste à soustraire le Cq du gène de référence de celui d'intérêt du même échantillon ce qui nous donne un ΔCq ($\Delta Cq = Cq \text{ intérêt} - Cq \text{ référence}$). Le gène de référence dans ce mémoire est RPLP0. Ensuite, le ΔCq de la condition contrôle est soustrait des ΔCq pour relativiser ce qui donne un $\Delta\Delta Cq$ ($\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ intérêt} - \Delta Cq \text{ ctrl}$). Enfin, les données sont rendues biologiquement interprétables par puissance 2 ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) car à chaque cycle un brin d'ADNc donne deux autres brins. Le « - » dans l'exposant exprime le principe de la réaction qui veut que, plus il faut de cycles pour que la fluorescence atteigne le seuil, moins il y a de matériel dans l'échantillon.

Un contrôle négatif de la transcription inverse est obtenu en mettant 5 μl (SYBRgreen) ou 4 μl (TaqMan) d'ARN de chaque échantillon dans les puits (au lieu de l'ADNc). La même chose est réalisée avec de l'eau *RNase-free* pour vérifier qu'il n'y a pas d'ADN contaminant présent dans celle-ci ainsi qu'une dimérisation des primers. Enfin pour le SYBRgreen, une courbe de dissociation permet de vérifier qu'un seul gène est amplifié en ayant un seul pic à la température où 50% des amplicons sont dissociés.

Tableau 7: Matériels et produits utilisés lors de l'analyse de l'expression protéique

Matériel

Mini râtelier	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Plaque 96 puits	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Vitres en verre	BioRad, Californie, USA
Peigne	BioRad, Californie, USA
Grille	BioRad, Californie, USA
Éponge	
Papier Whatman	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Membrane PVDF	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Hambourg, Allemagne
Spectrophotomètre VersaMax	Molecular Devices, Californie, États-Unis
ImageQuant Las4000mini system	GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni

Produits

Tampon de lyse réducteur		
- Tris-HCL 62.5mM pH 6.8	VWR International, Leuven, Belgique	
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 2%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	
- Glycérol 8.7%	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA	
- DTT (dithiotréitol) 0.2%	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA	
Tampon de lyse non réducteur		
- HEPES 50mM	VWR International, Leuven, Belgique	
- NaCl 150nM	VWR International, Leuven, Belgique	
- Igepal 0.2%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	
Pierce 660	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA	
Ionic detergent compatibility reagent	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	
Stacking gel 4%	Pour 10mL	
- Acrylamide/bis-acrylamide 40%	1ml	Merck, Darmstadt, Allemagne
- Tris/HCL 0.5M pH 6.8	2.5ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- SDS (sodium dodecylsulfate) 10%	0.1ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- APS (Ammonium Persulfate) 10%	0.05ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- TEMED	0.01ml	Merck, Darmstadt, Allemagne
(Tetramethylethylenediamine)		
- H ₂ O _d	6.34ml	
Running gel 7.5%	Pour 10mL	
- Acrylamide/bis-acrylamide 40%	1.875ml	Merck, Darmstadt, Allemagne
- Tris/HCL 1.5M pH 8.8	2.5ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- SDS 10%	0.1ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- APS 10%	0.1ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- TEMED	0.01ml	Merck, Darmstadt, Allemagne
- H ₂ O _d	5.415ml	
Running gel 12.5%	Pour 10mL	
- Acrylamide/bis-acrylamide 40%	3.12ml	Merck, Darmstadt, Allemagne
- Tris/HCL 1.5M pH 8.8	2.5ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- SDS 10%	0.1ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- APS 10%	0.1ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- TEMED	0.01ml	Merck, Darmstadt, Allemagne
- H ₂ O _d	4,17ml	

Analyse de l'expression protéique de protéines d'intérêts (Tableau 7)

Principe

Le *Western blot* est une technique semi-quantitative utilisée pour analyser la quantité de protéines dans différentes conditions ainsi que la taille de la protéine d'intérêt. Les protéines, préalablement dénaturées et polarisées négativement, sont chargées sur un gel de polyacrylamide et séparées en fonction de leur poids moléculaire en migrant d'une cathode à une anode. Après migration, elles sont transférées sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) permettant la révélation de la protéine grâce à un anticorps primaire qui reconnaît la protéine d'intérêt, reconnu lui-même par un anticorps secondaire conjugué à la HRP (horse radish peroxidase). La membrane est interprétable grâce à un substrat qui est clivé par la peroxydase et visualisé par chémoluminescence.

Extraction protéique

Monocouche de kératinocytes

Les échantillons sont décongelés de -80°C en les mettant sur glace pour inhiber les protéases. Dans des conditions expérimentales réductrices, les protéines sont extraites des cultures chimiquement avec du tampon de lyse et mécaniquement par grattage avec un mini râpeau. Après cela, le tampon de lyse réducteur avec les cellules est récupéré et transféré dans un eppendorf à col vissé qui sera mis à chauffer au bain marie à 100°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines.

Dans les conditions non réductrices utilisées pour l'anticorps anti-IL-4R α , l'extraction se fait par un tampon de lyse sans DTT ni SDS (sodium dodecyl sulfate). Par ailleurs, les échantillons ne sont pas chauffés.

RHE

Les RHE sont décongelés de -80°C et mis sur glace. Le RHE, récupéré de l'insert, est déposé dans 200 μl de tampon de lyse. Le tube est chauffé au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes dans le but de décoller le RHE du filtre en polycarbonate. Pour récolter le maximum de protéines, le filtre est gratté à l'aide d'un *tips*. Le tout est de nouveau chauffé au bain-marie pendant 2 minutes.

Dosage protéique

La quantité de protéines par échantillon est analysée par le Pierce 660. 75 μl de Pierce 660 et 5 μl d'échantillon dilué 4 fois sont déposés sur une plaque 96 puits. Au Pierce 660 est rajoutée une poudre inhibitrice de SDS, ionic detergent compatibility reagent (IDCR) à raison de 1 g de cette poudre dans 20 ml de Pierce 660 pour éviter les précipités. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations connues de BSA (Bovin sérum albumine) : 4, 2, 1, 0,5 et 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Une fois la plaque terminée, elle est placée, après 5 minutes d'agitation dans le noir, dans un spectrophotomètre pour calculer l'absorbance à 660 nm.

Electrophorèse et transfert

Les protéines sont chargées sur un gel de polyacrylamide contenant un ratio d'acrylamide/bis acrylamide différent en fonction de la taille de la maille voulue. Deux types de gel vont être coulés entre deux vitres imperméables, le running et le stacking gel. Premièrement, le running gel, plus concentré et à pH 8,8, sert à la migration des protéines. Un fin filet d'eau est placé

Produits

Tampon d'électrophorèses

- *Tris-Base 25mM pH 8.3 3%* *UCB, Bruxelles, Belgique*
(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)
- *Glycine 192mM* *Merck, Darmstadt, Allemagne*
- *SDS 0.1%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- *H₂O_d*

Bleu de charge réducteur

- *Tris-HCL 62.5mM pH 6.8* *VWR International, Leuven, Belgique*
- *SDS 2%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- *Glycérol 8.7%* *Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*
- *DTT 0.2%* *Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*
- *Bleu de bromophénol 0.05%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*

Bleu de charge non réducteur

- *Tris-HCL 62.5mM pH 6.8* *VWR International, Leuven, Belgique*
- *SDS 2%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- *Glycérol 8.7%* *Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*
- *Bleu de bromophénol 0.05%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*

Tampon de transfert

- *Tris-Base 25mM pH 8.3 3%* *UCB, Bruxelles, Belgique*
- *Glycine 192mM* *Merck, Darmstadt, Allemagne*
- *Méthanol 20%* *Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*
- *H₂O_d*

PBS (Phosphate Buffered Saline) 7.2

- *KCL 2.7mM* *Merck, Darmstadt, Allemagne*
- *KH₂PO₄ 15mM* *Merck, Darmstadt, Allemagne*
- *NaCL 140mM* *VWR International, Leuven, Belgique*
- *Na₂HPO₄2H₂O 8.1mM* *Vel, Texas, USA*

TBS (tris-buffered salin) 7.6

- *Tris-Base 25mM pH 8.3* *UCB, Bruxelles, Belgique*
- *KCL 2.7mM* *Merck, Darmstadt, Allemagne*
- *NaCl 140mM* *VWR International, Leuven, Belgique*
- *H₂O_d*

Solution de lavage

- *PBS ou TBS*
- *Tween 20 0.1%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*

Solution de saturation

- *PBS ou TBS*
- *Tween 20 0.1%* *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- *Lait 5%* *Nestlé, Anderlecht, Belgique*

ou

BSA (Bovin serum albumin) 5%

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Solution de révélation

Roche Diagnosis, Vilvoorde, Belgique

(BM Chemiluminescence blotting substrat)

Re Blot Plus Strong

Merck, Darmstadt, Allemagne

pour avoir une belle ligne au niveau du running gel. Après polymérisation du premier gel, le stacking gel, moins condensé et à pH 6,8, permet l'empilement des protéines. Une fois ce gel coulé, un peigne est placé au-dessus pour dessiner les puits où les échantillons seront chargés.

Une fois les gels coulés et polymérisés, ils sont placés dans une cuve remplie de tampon d'électrophorèse. Les puits sont chargés avec 25 µg de protéines diluées avec de l'eau distillée et du bleu de charge permettant la visualisation du front de migration par la présence de bleu de bromophénol.

Après cela, le running gel est récupéré et équilibré dans le tampon de transfert. Le tampon de transfert doit être froid pour ne pas brûler le gel lors du transfert. Un sandwich est réalisé en commençant par la grille blanche qui sera placée au niveau de l'anode, une éponge et un papier Whatman imbibés de tampon de transfert, la membrane PVDF activée dans du méthanol et rincée dans le tampon, le gel, un papier Whatman et une éponge imbibés de tampon de transfert et enfin la grille noire placée au niveau de la cathode. Cette disposition permettra aux protéines de transférer du gel à la membrane car elles sont chargées négativement et migrent donc de la cathode à l'anode. Le sandwich est placé dans une cuve remplie de tampon de transfert. Cette cuve est mise sur un support avec de la glace et placée dans un frigo sur un agitateur magnétique.

Révélation

La membrane est récupérée et est lavée 3 fois dans de la solution de lavage. Le tween 20 est un détergent doux qui permet de détruire les liaisons aspécifiques entre l'anticorps et la protéine ce qui diminue le bruit de fond. La membrane est bloquée dans de la solution de saturation pendant 90 minutes à RT ou *overnight* à 4°C. La saturation est une technique pour empêcher les liaisons non-spécifiques entre les anticorps et les protéines en saturant la membrane en protéines, ce qui permet d'éviter le bruit de fond. Ensuite l'anticorps primaire (tableau 10) dilué dans la solution de saturation est incubé 90 minutes à RT ou *overnight* à 4°C. Après trois lavages, l'anticorps secondaire (tableau 11) dilué également dans la solution de saturation est incubé 90 minutes à RT. La membrane est ensuite placée dans la solution de révélation pendant une minute après trois lavages. La révélation se fait par chemiluminescence avec l'ImageQuant Las4000mini system. Entre chaque révélation, la membrane est strippée par du Re Blot Plus Strong 10 fois dilué dans de l'eau distillée. La membrane est conservée à -20°C.

Pour la révélation de STAT6-phosphorylé, le TBS et la BSA sont utilisés respectivement à la place du PBS et du lait. Ceci est dû au fait que la phosphorylation de STAT6 peut être perturbée par les phosphates présents dans le PBS.

Tableau 8: Matériels et produit utilisés lors de la fixation et les coupe en marquage histochimique

Matériel

Cassettes histologiques	
Cuvette en inox	
Lame de verre Superfrost +	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Histostar	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Microtome	Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne
Cryostat	Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne

Produits

EFA (ethanol-formal-acetic)	
- formaline 4%	VWR International, Leuven, Belgique
- éthanol 70%	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- acide acétique glacial 5%	VWR International, Leuven, Belgique
Paraffine	VWR International, Leuven, Belgique
Méthanol	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
PBS pH 7.2 stérile	
- KCL 2.7mM	Merck, Darmstadt, Allemagne
- KH_2PO_4 15mM	Merck, Darmstadt, Allemagne
- NaCL 140mM	VWR International, Leuven, Belgique
- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 8.1mM	Vel, Texas, USA
PFA (paraformaldehyde acid)	Merck, Darmstadt, Allemagne
Formol	Medite, Burgdorf, Suisse
Acide acétique	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Toluol	VWR International, Leuven, Belgique
OCT (optimal cutting temperature)	Tissue-Tek, Sakura Finetek, Californien USA

Marquage immunohistochimique (Tableau 8)

Principe

Le marquage immunohistochimique permet la visualisation d'une protéine d'intérêt sur lame histologique par un anticorps primaire reconnaissant cette protéine, lui-même reconnu par un anticorps secondaire. La révélation est réalisée soit par une peroxydase qui clive le substrat DAB (diaminobenzidine) ce qui donne un précipité brun, soit par fluorescence.

Fixation chimique

Tissus

Les tissus, découpés de 3 à 4 mm d'épaisseur, sont fixés dans l'EFA à raison de 20X le volume de l'échantillon pendant 24h. Les tissus sont ensuite enrobés. Ils sont déposés sur des cassettes histologiques pour les mettre dans un automate Histostar permettant l'imprégnation en paraffine des tissus. L'automate va d'abord déshydrater les échantillons dans du méthanol 70% puis dans du méthanol 100% et enfin dans du toluol pour passer d'une phase organique à une phase inorganique permettant l'imprégnation en paraffine des tissus. Après cela, les tissus sont placés obliquement avec la tranche de l'organe sur une cuvette en inox remplie de paraffine liquide chauffée à 60°C. Le dessus de la cassette est placé sur le moule et le tout est mis sur une plaque froide pour refroidir la paraffine et permettre ainsi de durcir le bloc.

Monocouche de kératinocytes

La fixation des cellules se fait sous hotte. Après traitement par la M β CD ou la stimulation par les interleukines, les cellules sont lavées 3 fois au PBS stérile et fixées pendant 15 minutes au PBS-PFA4%. Après trois lavages au PBS stérile, les boîtes multi-puits contenant les cellules sont placées au frigo à 4°C entourées de parafilm pour empêcher l'évaporation du PBS.

RHE

Les RHE sont fixés dans du formol 4% acide acétique 1% pendant 24h. Ensuite ils sont déshydratés dans trois bains de méthanol de 10 minutes. Après cela, le RHE est décroché de l'insert dans le toluol et placé pendant 1h dans une cuvette en inox elle-même remplie de toluol. Le RHE est rincé une fois dans de la paraffine puis placé dans un autre moule rempli également de paraffine pour l'imprégnation pendant 1h à > 50°C. Après cela, les échantillons sont placés verticalement et en oblique dans une cuvette en inox remplie de paraffine chauffée à 60°C pour une coupe ultérieure correcte. Le dessus de la cassette est placé sur le moule et les moules sont mis sur une plaque froide.

Fixation à froid des RHE

De l'OCT (optimal cutting temperature) est placé dans le fond d'un moule en plastique pour placer le RHE décroché de son insert, ensuite de l'OCT est placé tout autour du RHE. L'OCT est une solution visqueuse cryoprotectrice qui empêche la formation de cristaux de glace lors du durcissement du RHE par le froid. Le moule contenant le RHE est placé dans du méthanol à -80°C sans que l'OCT rentre en contact avec le méthanol. Une fois le bloc durci, il est placé à -80°C.

Coupe au microtome

Le microtome permet de couper les blocs en paraffine à l'échelle du micromètre. Les blocs de paraffine sont démoulés, placés sur la tête du microtome et dégrossis à 25 μ m. Après cela, les

Tableau 9: Matériels et produits lors de marquages immunohistochimiques et immunofluorescents et lors de la coloration en HE

Matériel

Microscope Olympus BX63	Olympus Corporation, Tokyo, Japon
Microscope confocal	Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne
Cellules Lab-Tek	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Tissue stainer COT 20	Medite, Burgdorf, Suisse

Produits

Toluol	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Méthanol	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Tampon citrate 10mM pH 6	
- <i>Acide citrique</i> 210.14g/mol	<i>VWR International, Leuven, Belgique</i>
- H_2O_d	
PBS pH 7.2	
Glycine 0.1M	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Produits

H_2O_2	VWR International, Leuven, Belgique
BSA	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
BSA sans lipides	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Triton x100	Merck, Darmstadt, Allemagne
Epilife® complet	
DAB	Dako, Glostrup, Danemark
Haemalun	Medite, Burgdorf, Suisse
Isopropanol	Medite, Burgdorf, Suisse
DPX	VWR International, Leuven, Belgique
Mowiol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Lysénine	Dr Donatienne, université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique

blocs sont durcis dans de l'eau glacée pour faciliter la coupe en coupons de 6 μm . Les coupons sont placés dans une farde fermée pour le transport jusqu'au bain marie à 45°C permettant de les détacher les uns des autres et les coller sur une lame de verre Superfrost + chargées positivement recouverte de l'aminosilane, ce qui améliore l'adhérence. Les lames sont séchées pendant 24h sur un portoir puis placées dans une boîte à température ambiante.

Coupe au cryostat

Le cryostat qui permet les coupes à congélation à l'échelle du micromètre est une enceinte refroidit à -20°C, contenant le couteau. Une noisette d'OCT est placée sur une platine en métal pour y coller l'échantillon congelé. Le tout est placé sur une plaque froide accélérant le collage. Après cela, l'échantillon est placé sur la tête du microtome, dégrossi à 40 μm et des coupons de 10 μm sont réalisés. Le coupon est aspiré par une lame de verre Superfrost + grâce à la différence de température entre le coupon (-20°C) et la lame (température ambiante). Les lames sont ensuite rapidement placées à -80°C pour être conservées. Les coupes à congélation sont fixées avec de la PBS-PFA 4% pendant 15 minutes à RT ou le méthanol/acétone pendant 20 minutes à -20°C.

Marquages immunohistochimiques et immunofluorescents (Tableau 9)

Tissus et RHE

Les lames sont déparaffinées en passant dans des bains de 2,5 minutes chacun, deux de toluol, réhydratées dans deux de méthanol 100% et un de méthanol 70% et blanchies dans deux d'eau de ville.

Si nécessaire, les lames sont démasquées par du tampon citrate 10 mM pH6 pendant 20 minutes dans un bain-marie à 100°C. Le démasquage est utilisé pour casser la liaison formée par le formaldéhyde lors de la fixation ce qui change la conformation 3D de la protéine. Cette technique permet de libérer des antigènes possiblement cachés lors de la fixation.

Après que les lames aient refroidis, celles-ci sont rincées dans du PBS et incubées dans trois bains de glycine 0,1 M. La glycine est un petit acide aminé permettant la saturation des groupements aldéhydes qui pourraient interagir de manière non-spécifique avec les anticorps. De plus, les aldéhydes sont auto-fluorescents et donc la glycine diminue le bruit de fond en immunofluorescence. Pour l'immunoperoxydase, après un rinçage dans le PBS, les lames sont plongées dans du PBS-H₂O₂ 3% pendant 10 minutes pour saturer les peroxydases endogènes.

Après deux rinçages dans le PBS, les échantillons sont bloqués pendant 1h dans le PBS-BSA0,2% ou du PBS-BSA0,2%-Triton x100 0,02% pour la perméabilisation. Ensuite, les lames sont incubées dans une goutte de 50 μl d'anticorps primaire (tableau 10) dilué dans le PBS-BSA0,2%(-Triton x100 0,02%) *overnight* à 4°C dans une chambre humide. Après trois rinçages, les lames sont incubées dans une goutte de 50 μl d'anticorps secondaire (tableau 12) couplé à la biotine (immunoperoxydase) ou à un fluorochrome (immunofluorescence) et dilué dans le PBS-BSA0,2%(-Triton x100 0,02%) 1h à RT dans une chambre humide. L'incubation de l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome se fait à l'obscurité.

Pour l'immunoperoxydase, après trois rinçages, l'incubation d'une goutte de 50 μl de solution A+B (streptavidine-HRP ; Vectastain kit) dilué 200X dans le PBS-BSA0,2% est réalisée pendant 45 minutes dans une chambre humide. Après trois rinçages au PBS-BSA0,2%, la révélation est réalisée au microscope. Une goutte de DAB est placée sur l'échantillon et la

Tableau 10: Anticorps primaire utilisés lors du western blot et de l’immunomarquage

Anticorps	Firme	Isotype	Source	Dilution
RPL13a	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Lapin	1/1000
IL-13Ra2 (1)	R&D system, Minneapolis, USA	Polyclonal	Chèvre	1/750
IL13Ra2 (2)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Polyclonal	Lapin	1/250
IL4RA	R&D system, Minneapolis, USA	monoclonal	Souris	1/500
P-STAT6	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Lapin	1/1000
STAT6	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Lapin	1/1000
EEA1	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Lapin	1/100

Tableau 11: Anticorps secondaire utilisé lors du Western Blot

Anticorps	Firme	Isotype	Source	Dilution
Anti-rabbit HRP	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Chèvre	1/1000
Anti-goat HRP	Dako, Glostrup, Danemark	Polyclonal	Lapin	1/1000
Anti-mouse HRP	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Cheval	1/1000

Tableau 12: Anticorps secondaire utilisé lors de l’immunomarquage

Anticorps	Firme	Isotype	Source	Dilution
Anti-Rabbit Alexa 568	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA	Polyclonal	Chèvre	1/1000
Anti-goat Alexa 568	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA	Polyclonal	Âne	1/1000
Anti-mouse Alexa 488	Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas	Polyclonal	Chèvre	1/1000
Anti-goat Vectastain kit	Vector Laboratories, Californie, USA	Polyclonal	Lapin	1/1000

réaction est stoppée en plongeant les lames dans l'H₂O_d. Pour toutes les lames d'une même expérience, le même temps d'incubation du DAB est utilisé. Les lames sont contre-colorées dans un bain d'haemalun pendant 4 secondes, lavées dans deux bains d'eau courante et déshydratées à l'isopropanol et puis au toluol. Cette étape permet de passer d'une phase organique à inorganique pour monter les lames au DPX. Celles-ci sont laissées sécher une journée sur du marbre surmonté d'une pierre.

Pour l'immunofluorescence, après trois rinçages au PBS-BSA0,2%(-Triton x100 0,02%), les lames sont incubées dans une goutte de 50 µl d'Hoechst dilué 200X dans le PBS-BSA0,2%(-Triton x100 0,02%) à RT pendant 15 minutes dans une chambre humide à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS-BSA0,2%(-Triton x100 0,02%) et un rinçage au PBS, un montage au Mowiol est réalisé.

Après une journée de séchage, les lames peuvent être observées au microscope Olympus BX63.

Monocouche de kératinocytes

Après deux rinçages dans le PBS, les lamelles porte-objets sur lesquelles ont été cultivés les kératinocytes sont incubées dans trois bains de glycine 0,1 M, lavées deux fois au PBS et bloquées pendant 1h dans le PBS-BSA0,2% ou du PBS-BSA0,2%-Triton x100 0,02% pour la perméabilisation. L'immunofluorescence et le montage au Mowiol est réalisés comme décrit ci-dessus. Les lames sont observées dans un microscope Olympus BX63 ou grâce à un microscope confocal.

Dans ce mémoire, un co-marquage d'EEA1 et IL-4Rα est réalisé. Comme les 2 anticorps primaires sont reconnus par des anticorps secondaires différents et que ces anticorps secondaires ne se reconnaissent pas entre eux, les étapes de l'immunomarquage sont les mêmes que pour l'immunofluorescence normale en mettant les anticorps primaires ensemble et les secondaires également.

Co-marquage des microdomaines lipidiques et IL-4Rα dans des kératinocytes cultivés en monocouche

Les microdomaines lipidiques sont révélés grâce à la sonde lysénine (Mound *et al.*, 2017). Les cellules sontensemencées à raison de 10 000 cellules/cellule Lab-Tek dans un volume de 400 µl de milieu complet Epilife® et le milieu est changé tous les deux jours. À confluence, les cellules sont d'abord fixées au PBS-PFA4% pour réaliser l'immunofluorescence d'IL4Rα et ensuite la sonde lysénine est insérée dans les microdomaines lipidiques, ou inversement, la sonde est insérée dans les microdomaines avant la fixation. La fixation et le marquage se réalisent comme décrit ci-dessus excepté l'utilisation d'un volume de 100 µl pour la fixation et l'incubation des anticorps et l'utilisation d'une BSA sans lipides. De plus, l'incubation du Hoechst n'est pas réalisée.

Pour l'insertion de la sonde, les cellules sont rincées trois fois dans le PBS ou le milieu complet Epilife®. Celui-ci est utilisé pour le rinçage des cellules lors de l'insertion de la sonde avant la fixation. La sonde est diluée à du 1,25 µM dans la PBS-BSA0,1% ou le milieu complet Epilife®-BSA0,1% et ensuite les tubes sont centrifugés à 14 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C pour déposer les agrégats de sondes au fond du tube. Le surnageant est récupéré et après homogénéisation, 100 µl de la sonde sont déposés sur les cellules. Après 15 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont rincées. Il est important de mettre les cellules à 4°C pour

que la sonde ne soit pas internalisée dans les cellules non fixées, ce pourquoi le milieu complet Epilife® doit également être froid. De plus, les cellules non fixées sont directement observées au microscope confocal avant fixation. Pour ce faire les cellules sont incubées dans le milieu complet Epilife® chaud lors de l'observation, puis sont immédiatement fixées par une solution de PFA.

RESULTATS

RESULTATS

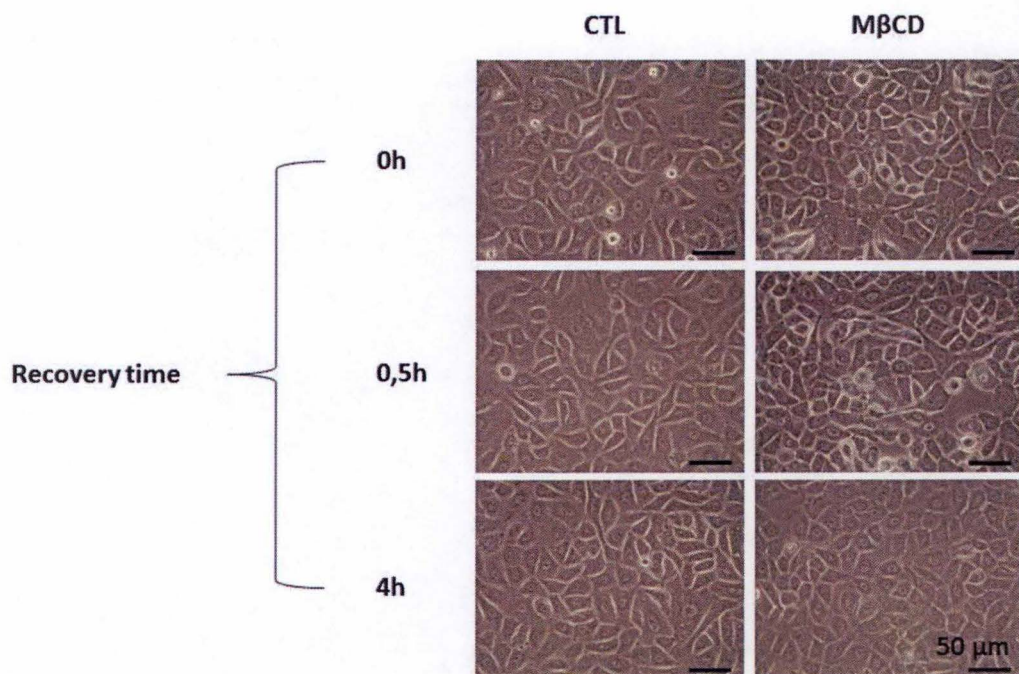


Figure 1: Morphologie des kératinocytes après traitement à la MβCD.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 heure, 30 minutes et 4 heures. Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans un milieu autocrine. La morphologie a été analysée avec le microscope par contraste de phase. La barre de l'échelle est de 50μm.

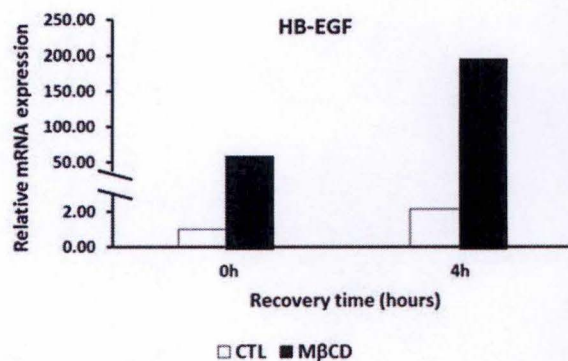
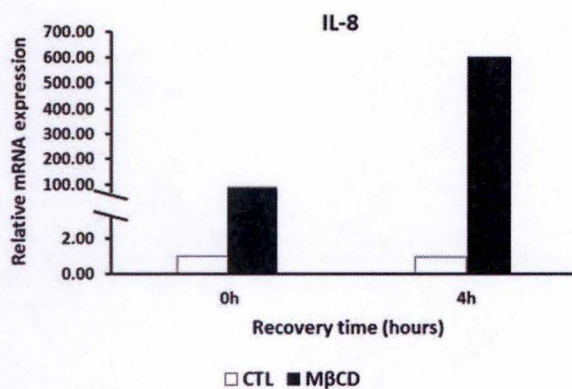


Figure 2: Expression relative en ARNm d'IL-8 et d'HB-EGF.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 et 4 heures. Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans un milieu autocrine. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence (n=1).

Modèles du mémoire

Afin d'étudier les récepteurs aux interleukines 4 et 13 et plus spécifiquement leur régulation par les microdomaines lipidiques, deux modèles ont été comparés, le modèle de culture de kératinocytes en monocouche et les RHE. Pour ce faire, les kératinocytes et les RHE ont été traités par la M β CD avec différents temps de récupération afin de perturber les microdomaines lipidiques. La régulation de ces récepteurs a également été analysée en incubant les kératinocytes ou les RHE, pendant les temps de récupération, dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25 dans le but de voir si une réponse synergique est engendrée. Les cellules non traitées par la M β CD avec les mêmes conditions de temps de récupération et de milieux servent dès lors de contrôle au traitement.

Au début de ce projet, le modèle de culture de kératinocytes en monocouche traités par la M β CD a été validé morphologiquement par rapport à ce qui a déjà été observé précédemment au laboratoire. En effet, une altération de la morphologie est observée après une déplétion en cholestérol de la membrane plasmique dans les kératinocytes humains suggérant que les microdomaines lipidiques participent à la morphologie des kératinocytes (Jans *et al.*, 2004). Dans ce travail, les kératinocytes à confluence ont été traités par la M β CD à 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 0,5 et 4 heures. Une modification de la morphologie avec des espaces intercellulaires plus larges est observée juste après le traitement. Les kératinocytes reviennent à leur état normal après 4 heures de récupération, vraisemblablement du fait que ces cellules sont capables de synthétiser le cholestérol (Giltaire *et al.*, 2011) (voir figure 1).

Par ailleurs, le modèle a été validé au niveau transcriptionnel c'est-à-dire au niveau de l'expression relative en ARNm. En effet l'expression relative en ARNm des gènes de l'IL-8 et de l'HB-EGF augmente dans les kératinocytes traités par la M β CD (Mathay *et al.*, 2011). Dans ce travail, les kératinocytes à confluence ont été traités par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 et 4 heures. L'expression relative de l'ARNm de ces deux gènes a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen. Une augmentation de l'expression relative en ARNm de l'IL-8 et de l'HB-EGF est observée juste après traitement par la M β CD ainsi qu'après 4 heures de récupération (voir figure 2).

Ces analyses permettent donc de montrer que la M β CD induit bien les effets attendus sur les souches de kératinocytes utilisées dans ce travail. La M β CD sera donc utilisée dans la suite de ce mémoire afin de désorganiser les microdomaines lipidiques et d'investiguer la régulation des sous-unités des récepteurs aux interleukines 4 et 13.

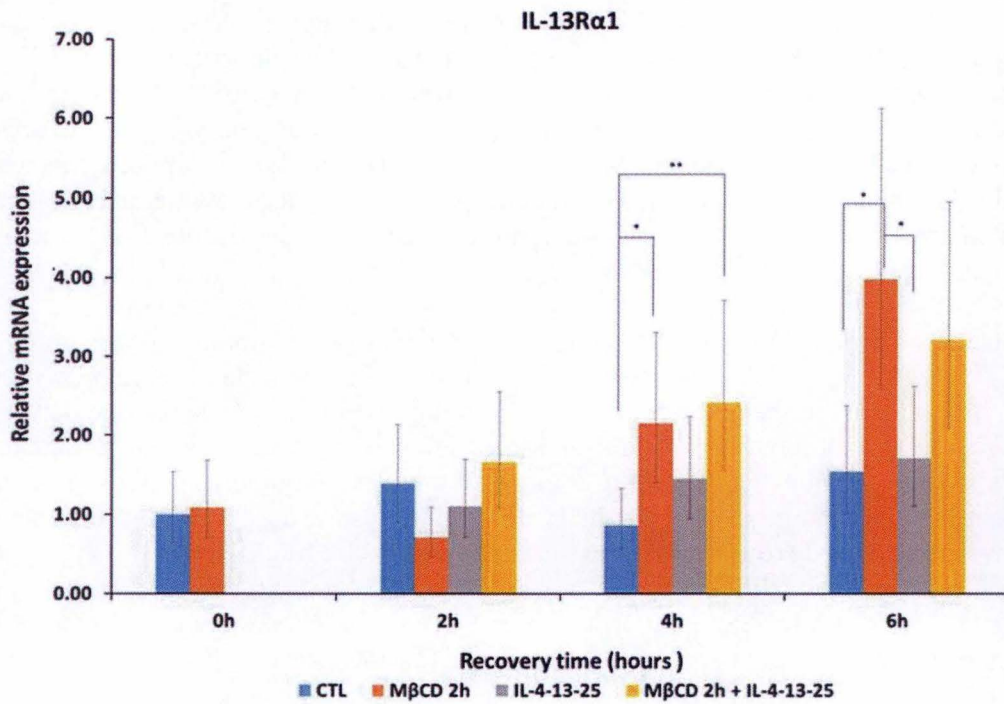


Figure 3: Expression relative en ARNm d'IL-13R α 1.

Les RHE ont été traités à J+11 à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 2, 4 et 6 heures dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25 et dans un milieu normal. Les RHE contrôles non traités à la MβCD ont été incubés dans les mêmes conditions de temps et de milieux. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence. La barre d'erreur représente 95% d'intervalle de confiance (n=3, ANOVA 2 repeated measures, *P<0.05, **P<0.01).

Régulation des sous-unités IL-13R α 1 et IL-4R α lors de la perturbation des microdomaines lipidiques avec le traitement par la M β CD.

Pour donner suite à l'observation d'une réponse synergique entre les traitements par les interleukines 4, 13 et 25 et par la M β CD (De Vuyst *et al.*, 2016a), les deux sous-unités, IL-4R α et IL-13R α 1, ont été analysées dans le but de vérifier si les microdomaines lipidiques les régulent. Premièrement, la régulation au niveau transcriptionnelle et protéique par les microdomaines lipidiques mais également par leurs ligands a été étudiée. Ensuite la localisation et les voies de signalisation activées par ces récepteurs ont été investiguées.

Régulation de l'expression transcriptionnelle et protéique

L'expression relative en ARNm d'IL-13R α 1 a déjà été investiguée dans des cultures de kératinocytes en monocouche par Maureen Bourtembourg qui démontre que la perturbation des microdomaines lipidiques n'a pas d'effet significatif sur l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 1 (Bourtembourg, 2016). De ce fait, l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 1 a été analysée dans les RHE par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen. Les RHE, traités par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures à J+11, ont été analysés après 0, 2, 4 et 6 heures de récupération dans un milieu contenant le mix d'interleukines ou dans le milieu de base. Après 4 et 6 heures de récupération, une augmentation significative de l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 1 est observée dans les RHE déplétés en cholestérol (voir figure 3). Ces résultats ne correspondent donc pas avec ceux observés par Maureen Bourtembourg (Bourtembourg, 2016).

Cependant, l'expression transcriptionnelle de ce gène avait été analysée uniquement après 0, 1, 4 et 24 heures de récupération (Bourtembourg, 2016). Etant donné qu'en RHE, l'augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 1 est visible notamment après 6 heures de récupération, l'augmentation de cette expression pourrait peut-être se trouver détectée dans des kératinocytes cultivés en monocouche après des temps de récupération se situant entre 4 et 24 heures. Une analyse de cette expression a donc été réalisée sur des kératinocytes traités par la M β CD après 6 et 8 heures de récupération. Néanmoins, aucune variation de l'expression relative en ARNm de ce gène n'est observée dans les cellules traitées et dans les cellules contrôles (résultats non montrés).

Par ailleurs, une augmentation significative de l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 1 est également observée dans les RHE traités par la M β CD après 4 heures de récupération dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25 (voir figure 3).

Ensuite, l'expression relative en ARNm d'IL-4R α a été analysée dans les modèles à deux et à trois dimensions. M. Bourtembourg a réalisé une investigation de cette expression par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen sur des cultures de kératinocytes en monocouche. Néanmoins, les Cq tellement élevés ne permettaient pas de savoir si le signal était dû à l'expression de cette sous-unité ou à un bruit de fond (Bourtembourg, 2016). La méthode TaqMan a donc été utilisée pour augmenter la spécificité de la technique. En effet, la méthode TaqMan consiste en une sonde qui va venir se placer sur l'ADNc d'intérêt entre les séquences reconnues par les deux primers. Cette sonde contient à l'extrémité 5', une fluorophore et à l'extrémité 3', une désactivateur. Une fois cette sonde clivée par la polymérase lors de la polymérisation, elle va relarguer le fluorophore pouvant émettre un signal puisqu'il est assez éloigné du désactivateur.

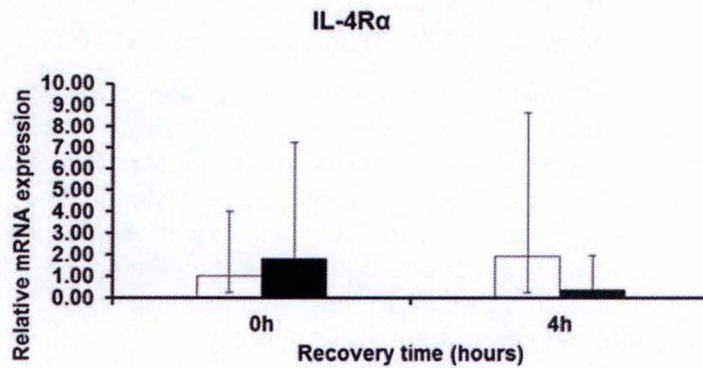


Figure 4: Expression relative en ARNm d'IL-4Ra.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la M β CD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 et 4 heures. Les cellules contrôle non traitées à la M β CD ont été incubées dans un milieu autocrine. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode TaqMan et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence. La barre d'erreur représente 95% d'intervalle de confiance (n=3, ANOVA 2 repeated measures)

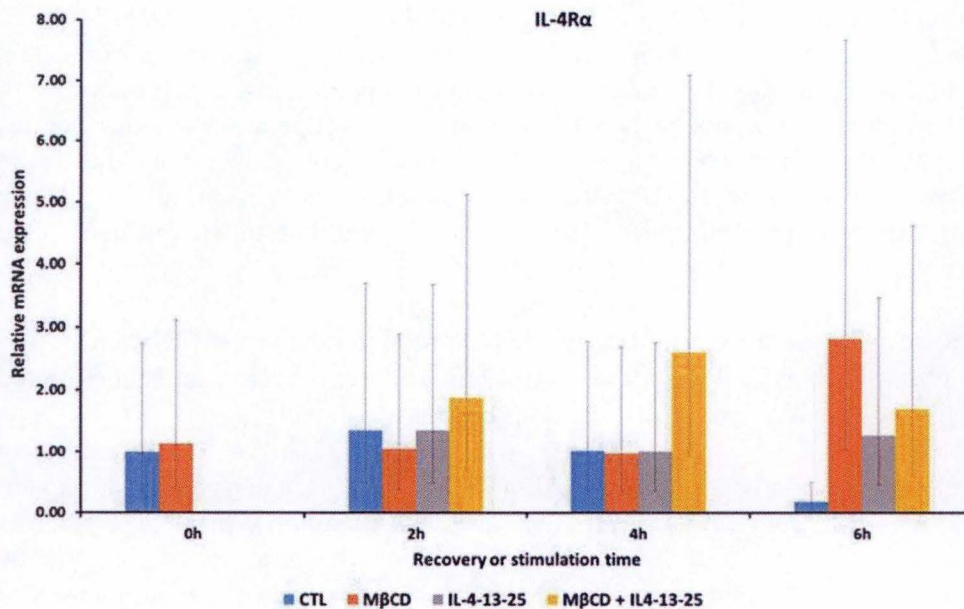


Figure 5: Expression relative en ARNm d'IL-4Ra.

Les RHE ont été traités à J+11 à la M β CD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 2, 4 et 6 heures dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25 et dans un milieu normal. Les RHE contrôles non traités à la M β CD ont été incubés dans les mêmes conditions de temps et de milieux. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode TaqMan et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence. La barre d'erreur représente 95% d'intervalle de confiance (n=3, ANOVA 2 repeated measures).

Les cellules en monocouche à confluence ont été traitées par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 et 4 heures. Néanmoins, aucune variation significative de l'expression relative en ARNm de ce gène n'est constatée dans ces conditions (voir figure 4).

Par ailleurs, au niveau des RHE traités par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures à J+11 avec des temps de récupération de 0, 2, 4 et 6 heures dans un milieu contenant le mix d'interleukines ou dans le milieu de base, aucune variation significative de l'expression relative en ARNm d'IL-4R α est observée dans les RHE contrôles, dans ceux traités par la M β CD, dans ceux traités par les interleukines et dans ceux traités par la combinaison des deux traitements (voir figure 5).

Ces résultats suggèrent que les traitements par la M β CD et par les interleukines, ensemble ou séparément, induisent aucune différence significative sur l'expression relative en ARNm d'IL-4R α mais induisent bien une augmentation faible mais significative de l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 1. Ces analyses doivent donc être confirmées par une étude de l'expression protéique.

L'expression protéique de ces sous-unités a d'abord été étudiée par M. Bourtembourg. Pour la sous-unité IL-13R α 1, l'anticorps n'a pas révélé de protéines en *Western Blot* tandis que pour IL-4R α , aucune variation de l'expression protéique n'a été observée dans les cellules traitées par la M β CD et dans celles non traitées. En revanche, dans le cas de l'immunofluorescence de cette sous-unité réalisée par M. Bourtembourg, une augmentation du signal dans les kératinocytes traités par rapport à ceux non traités est observée ce qui suggère une augmentation de l'expression de ce récepteur (Bourtembourg, 2016). Ces résultats ne coïncident donc pas avec les résultats obtenus en RT-qPCR et en *Western Blot* suggérant un manque de spécificité de l'anticorps. L'analyse de la spécificité de cet anticorps a dès lors été réalisée par la transfection des cellules par électroporation de siARN dirigés contre l'ARNm d'IL-4R α .

En effet, les siARN induisent une dégradation de l'ARNm du gène d'intérêt en se liant dessus. Cela induit donc une diminution de l'expression de ce gène au niveau transcriptionnel et protéique. De cette manière, la spécificité des anticorps peut être analysée en *Western Blot* et en immunomarquage par une diminution du signal dans les cellules transfectées par les siARN dirigés contre l'ARNm du gène d'intérêt.

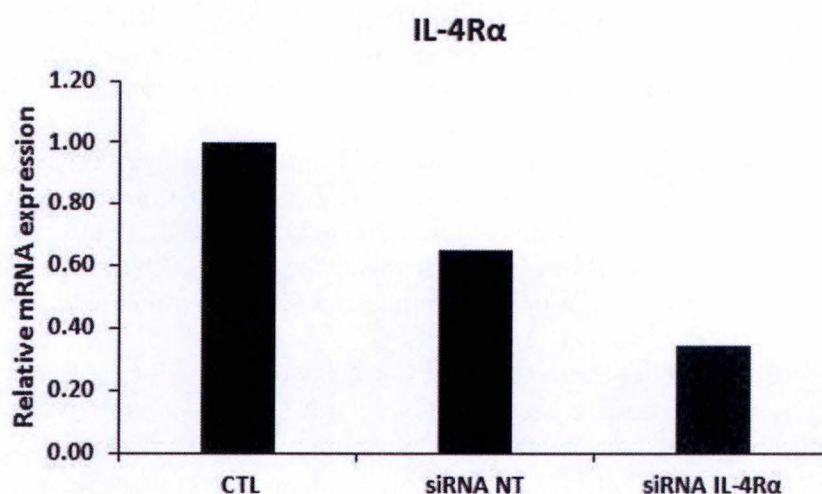


Figure 6: Expression relative d'IL-4Rα après électroporation

Les kératinocytes en monocouche ont été transfectés par électroporation avec des siARN dirigés contre IL-4Rα ou des siARN non-target (NT). Le contrôle de l'électroporation a été réalisé sur des cellules qui n'ont pas été transfectées avec des siARN (siRNA CTL) mais qui ont été électroporées. L'expression relative en ARNm a été analysée 24 heures après l'électroporation par la RT-qPCR avec la méthode TaqMan. RPLP0 a été utilisé comme gène de référence (n=2)

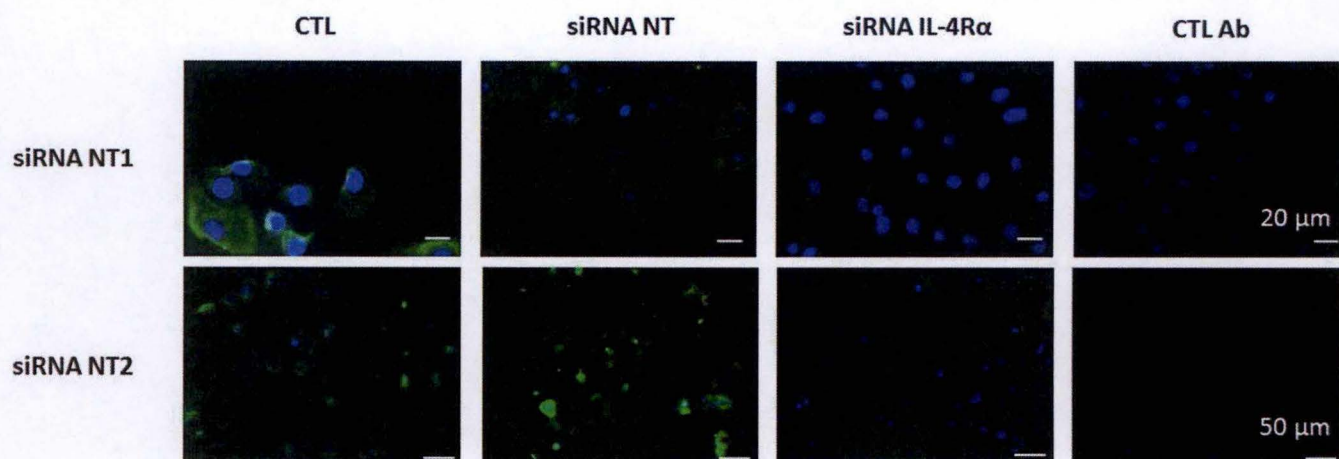


Figure 7: Expression protéique d'IL-4Rα après électroporation.

Les kératinocytes en monocouche ont été transfectés par électroporation avec des siARN dirigés contre IL-4Rα ou des siARN non-target (NT). Le contrôle de l'électroporation a été réalisé sur des cellules qui n'ont pas été transfectées avec des siARN (siRNA CTL) mais qui ont été électroporées. L'immunofluorescence a été réalisée 48 heures après l'électroporation et les cellules ont été fixées à la PFA et perméabilisées. La condition sans anticorps primaire est le "CTL Ab". Le noyau a été révélé par le Hoechst et IL-4Rα par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué avec l'Alexa 488. Les lames ont été visualisées avec le microscope à épifluorescence. La barre de l'échelle représente 20 et 50 μm. L'image montrée est représentative d'une expérience.

Analyse de la spécificité de l'anticorps anti-IL-4R α par diminution de l'expression génique d'IL-4R α en transfectant les kératinocytes par des siARN

Les cellules ont été transfectées par électroporation par des siARN dirigés contre l'ARNm d'IL-4R α mais également par des siARN non-target (NT) qui servent de contrôle étant donné que ces siARN ne sont dirigés sur aucun ARNm de gènes humains. Un deuxième contrôle a été réalisé sur des cellules qui ont subi uniquement une électroporation dans le but de vérifier que les réponses obtenues sont dues à la diminution de l'expression génique et non à l'électroporation.

24 heures après l'électroporation, l'expression relative en ARNm d'IL-4R α a été analysée pour évaluer l'efficacité de la diminution de l'expression génique par les siARN. Une diminution de l'expression relative en ARNm d'IL-4R α de 65,73% est observée dans les cellules transfectées par des siARN dirigés contre l'ARNm d'IL-4R α comparée à l'expression transcriptionnelle dans les cellules contrôles. Cependant, une diminution de cette expression de 35,16% est également constatée dans les cellules transfectées par les siARN NT (voir figure 6).

Deux possibilités peuvent expliquer ces résultats. La première est que le siARN va induire une inflammation par son entrée dans les cellules et donc réguler l'expression de certains gènes. La deuxième est que le siARN NT pourrait avoir un effet sur l'ARNm d'IL-4R α . Par ailleurs, certains chercheurs, en utilisant ce siARN ont découvert une diminution de l'expression d'EGFR suggérant que la deuxième hypothèse serait la plus probable. De ce fait, un deuxième siARN NT a été utilisé dans le but de comparer les résultats. Dès lors, le premier siARN NT diminuant l'expression relative en ARNm d'IL-4R α a été nommé siARN NT1 alors que le deuxième a été nommé siARN NT2.

L'analyse de l'expression protéique a donc été étudiée en immunofluorescence dans le but, cette fois, d'évaluer la spécificité de l'anticorps en immunomarquage. 48 heures après l'électroporation, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde et perméabilisées. 48 heures après l'électroporation, une diminution du signal est observée dans les cellules transfectées par les siARN dirigés contre l'ARNm d'IL-4R α . Une diminution, mais plus faible est également observée dans les cellules transfectées avec les siARN NT1 mais pas avec les siARN NT2 (Voir figure 7).

Malheureusement, l'expression relative en ARNm et en protéines n'a pas pu être étudiée dans les cellules transfectées avec les siARN NT2. En effet, d'autres souches de kératinocytes ont été transfectées puisque la souche de kératinocytes utilisée avec le siARN NT1 a été épuisée durant ce mémoire. Malheureusement, ces souches de kératinocytes ne semblent pas supporter l'électroporation étant donné qu'un taux de mort cellulaire élevé est induit ce qui a pour conséquence un manque de matériel pour pouvoir analyser l'expression transcriptionnelle et protéique.

Ces résultats suggèrent donc que l'anticorps anti-IL-4R α est spécifique en immunofluorescence. Une étude sur la localisation d'IL-4R α peut être donc réalisée avec cet anticorps lors de sa liaison au ligand ou lors de la déplétion en cholestérol des kératinocytes.

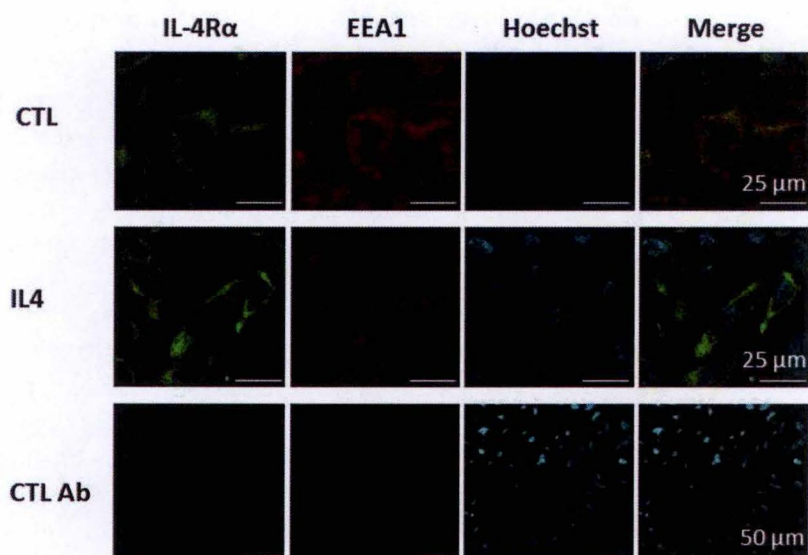


Figure 8: Localisation d'IL-4Rα après traitement aux IL-4.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence aux interleukines 4 pendant 14 heures. Les cellules contrôles non traitées aux interleukines ont été incubées dans le milieu autocrine. La localisation a été analysée par immunofluorescence au microscope confocal. Les cellules, fixées à la PFA, ont été perméabilisées. La condition sans anticorps primaire est le « CTL Ab ». Le noyau a été révélé par le Hoechst, l'IL-4Rα et EEA1 par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire, respectivement conjugué avec l'Alexa 488 et 568. La barre de l'échelle représente 25 ou 50μm. l'image montrée est représentative de 3 expériences.

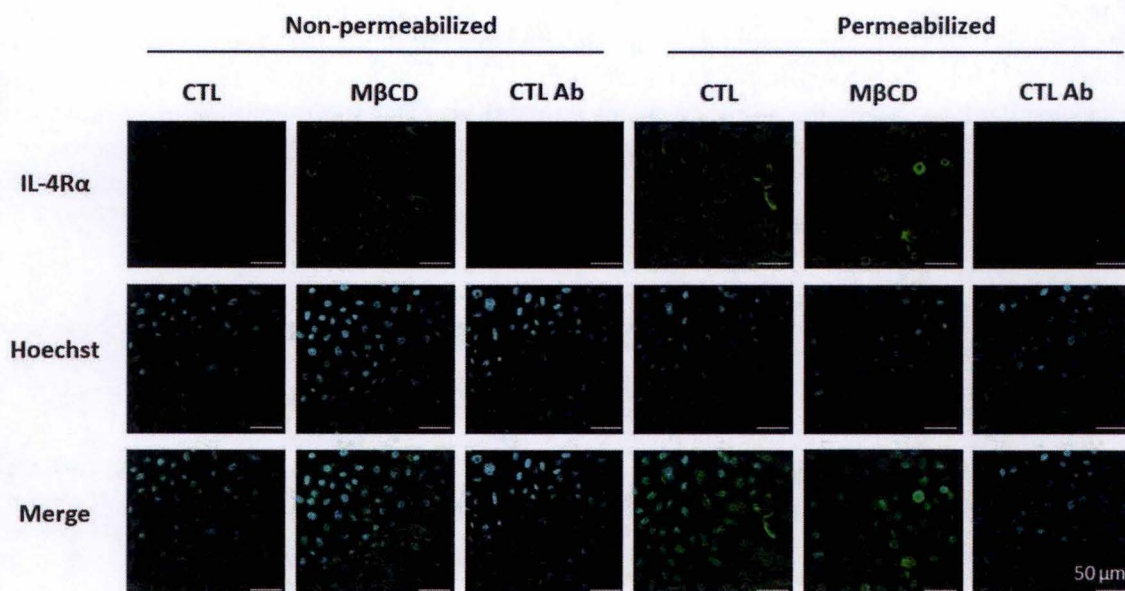


Figure 9: Localisation d'IL-4Rα après déplétion en cholestérol des kératinocytes.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 30 minutes. Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans un milieu autocrine. La localisation a été analysée par immunofluorescence au microscope confocal. Les cellules, fixées à la PFA, ont été perméabilisées ou non. La condition sans anticorps primaire est le « CTL Ab ». Le noyau a été révélé par le Hoechst et IL-4Rα par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué avec l'Alexa 488. La barre de l'échelle représente 50μm. l'image montrée est représentative d'une expérience

Régulation de la localisation d'IL-4R α

Lors d'une stimulation des kératinocytes par les interleukines 4, des études ont montré une internalisation d'IL-4R α . En effet, dans la littérature, il est mentionné qu'IL-4R α , après liaison avec son ligand, migre dans les endosomes corticaux au niveau des cellules du rein. Cela a pour but de concentrer cette sous-unité de récepteurs avec IL-2R γ ou IL-13R α 1 pour permettre une activation plus longue en diminuant la constante de dissociation des deux sous-unités (Kurgonaite *et al.*, 2015). M. Bourtembourg a vérifié ce phénomène en traitant les cellules par l'IL-4 pendant 14 heures et les a comparées aux cellules contrôles. L'IL-4R α avait été marqué par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome vert et les endosomes corticaux avaient été visualisés par un anticorps primaire dirigé contre EEA1 et reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome rouge (Alexa 568). Une colocalisation partielle semblait être présente dans les cellules traitées ainsi qu'une augmentation de l'internalisation du récepteur. Etant donné que cette expérience n'avait été réalisée qu'une seule fois, il a donc été nécessaire de la recommencer (Bourtembourg, 2016).

De ce fait, dans ce mémoire, l'expérimentation a été réalisée dans les mêmes conditions à trois reprises pour visualiser l'internalisation d'IL-4R α dans les endosomes corticaux. Une augmentation de l'internalisation est bien observée au moment du traitement des kératinocytes par l'IL-4 pendant 14 heures mais aucune colocalisation des deux protéines n'est observée (voir figure 8). Cela montre qu'IL-4R α ne se trouve pas dans les endosomes corticaux lors de son internalisation qui elle-même est augmentée quand l'IL-4 se lie à son récepteur

De plus, la régulation de la localisation d'IL-4R α est étudiée lors d'une déplétion en cholestérol de la membrane plasmique des kératinocytes. Les cellules à confluence ont été traitées par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 0,5, 4 et 24 heures. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde et certaines ont été perméabilisées et d'autres non. Après 0,5 heures de récupération, dans le cas des cellules perméabilisées, le même signal est observé dans les kératinocytes traités et dans les kératinocytes contrôles. En revanche, dans le cas des cellules non perméabilisées, une augmentation du signal est constatée dans les cellules traitées comparé à celui dans les cellules contrôles (voir figure 9). Ces observations ne sont pas présentes pour les temps de récupération de 0, 4 et 24 heures dont le signal ne diffère pas entre les différentes conditions (résultats non montrés). Cette analyse suggère donc qu'IL-4R α intercellulaire migrerait vers la membrane plasmique pour devenir membranaire lors d'une récupération courte après une déplétion en cholestérol de cette membrane.

Puisqu'un changement de localisation d'IL-4R α est observé lors d'une perturbation des microdomaines lipidiques, des expériences ont été réalisées dans le but de savoir si cette sous-unité se trouve au niveau de ces microdomaines lipidiques dans des cellules traitées par l'IL-4 et dans des cellules non traitées. Dans son mémoire, M. Bourtembourg a réalisé ce genre d'expérience par l'insertion de sondes lysénines conjuguées à la mCherry qui viennent spécifiquement s'attacher aux sphingomyélines, éléments majeurs des microdomaines lipidiques. La m-Cherry couplée à la sonde lysénine permet de visualiser ces microdomaines en rouge. La sonde a été insérée dans les microdomaines avant fixation des cellules. Les cellules ont été ensuite perméabilisées et IL-4R α a été marqué par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome vert (Alexa 488). Pour pouvoir visualiser cette colocalisation, il est important d'observer les cellules au microscope confocal au niveau de la membrane basale qui est une surface plane. Ceci permet d'éviter la visualisation des microvillosités présentes sur les membranes apicale et latérales où la sonde s'accumule ce qui peut donc interférer dans l'interprétation des résultats. Malheureusement les résultats obtenus

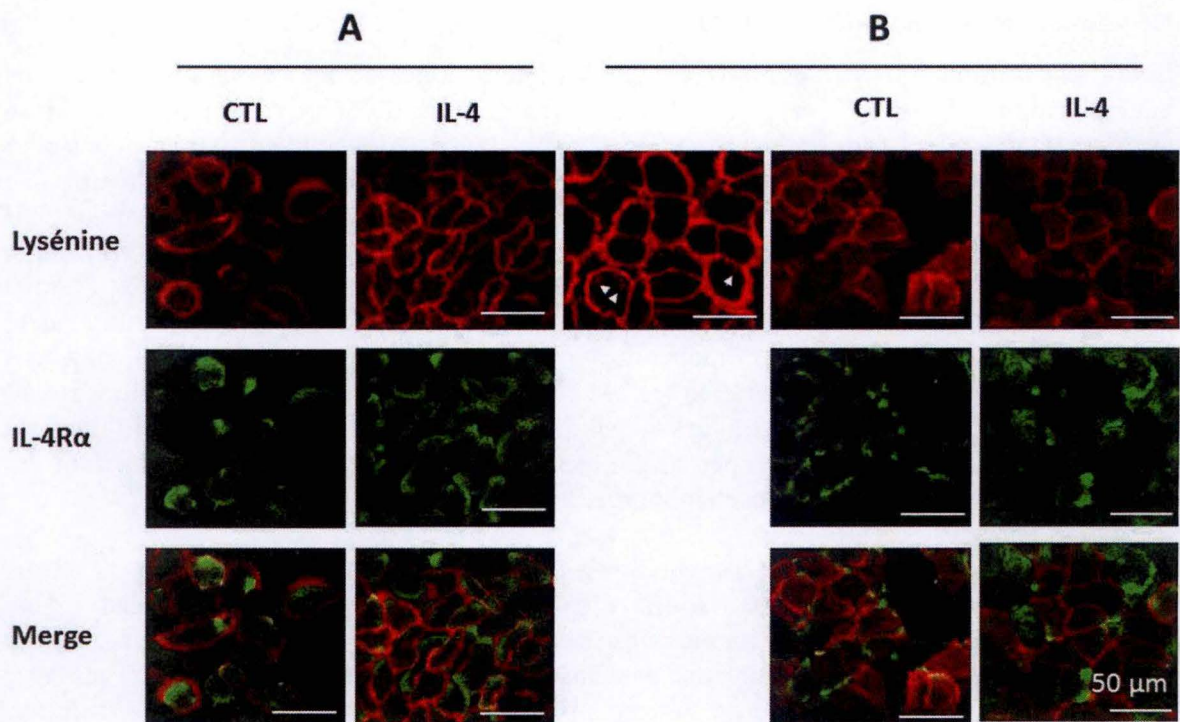


Figure 10: Localisation d'IL-4Ra dans les microdomaines lipidiques.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence aux interleukines 4 pendant 30 minutes. Les cellules contrôles non traitées aux interleukines ont été incubées dans le milieu Epilife complet. La localisation a été analysée par immunofluorescence au microscope confocal. (A) Les cellules ont été fixées à la PFA. D'abord, IL-4Ra a été marqué par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué avec l'Alexa 488 et ensuite les microdomaines ont été révélés par la sonde lysénine. (B) Les microdomaines ont été révélés avec la sonde lysénine avant la fixation à la PFA. Ensuite IL-4Ra a été révélé. La barre de l'échelle représente 50μm. l'image montrée est représentative d'une expérience.

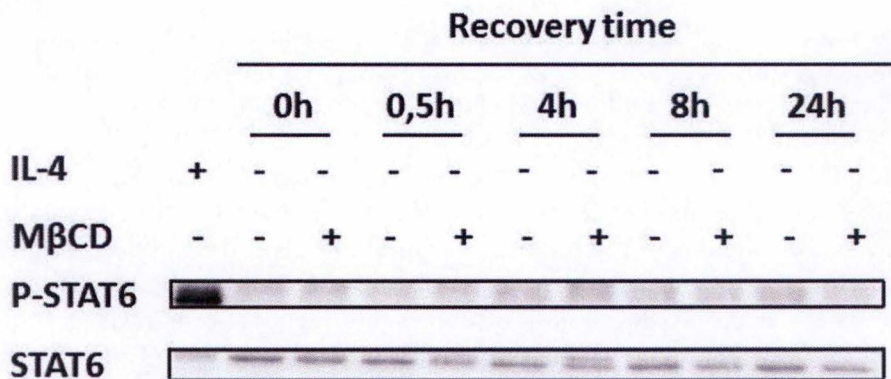


Figure 11: Signalisation des récepteurs aux interleukines 4 et 13.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 heure, 30 minutes et 4, 8 et 24 heures. Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans un milieu autocrine. Un contrôle positif avec des cellules traitées aux interleukines 4 pendant 48 heures a été réalisé. La signalisation a été analysée par la phosphorylation de STAT-6 par un Western Blot. L'image montrée est représentative de 3 expériences.

ne permettaient pas le marquage d'IL-4R α , probablement du fait que la sonde empêchait l'anticorps de se fixer à son antigène ou alors que cette sonde perturbait la membrane en bloquant les lipides et engendrait dès lors l'absence d'IL-4R α (Bourtembourg, 2016).

C'est pour cela que, dans ce travail, l'analyse de la localisation d'IL-4R α dans les microdomaines lipidiques a été réalisée avec quelques modifications du protocole de base. En effet, les cellules ont d'abord été fixées et perméabilisées pour permettre le marquage d'IL-4R α et ensuite incubées 15 minutes avec la lysénine. Par cette technique, le marquage est trop faible pour permettre une analyse de la colocalisation des deux éléments (résultats non montrés). Cette diminution du signal pourrait être due à la perméabilisation des cellules.

Ainsi, pour éviter ce problème technique, les deux protocoles ont été réalisés sur des cellules non perméabilisées. De plus, les cellules ont été traitées par les interleukines 4 pendant 30 minutes et d'autres non dans le but de voir si la liaison du ligand permet d'obtenir un changement d'affinité d'IL-4R α avec les microdomaines lipidiques comme observé avec de nombreux autres récepteurs de surface (Simons and Sampaio, 2011). En observant les cellules au microscope confocal, un marquage des microdomaines lipidiques et d'IL-4R α est retrouvé. Les microdomaines lipidiques sont représentés par les points rouges (voir figure 10; flèche). Aucune colocalisation n'est observée que les cellules aient été traitées par l'IL-4 ou non et quel que soit le protocole c'est-à-dire l'insertion de la lysénine avant fixation des cellules ou bien après le marquage d'IL-4R α suggérant que cette sous-unité de récepteur ne se localise pas dans les microdomaines lipidiques (voir figure 10).

Régulation de la signalisation

Pour l'instant, la régulation du récepteur de type 2 s'est portée sur l'expression de celui-ci ainsi que sur sa localisation dans les cellules. Un autre effet des microdomaines lipidiques sur ce récepteur pourrait être une régulation de son activation. C'est pourquoi, les voies de signalisation activées par ce récepteur ont été investiguées. La voie qui semble la plus intéressante est celle passant par JAK1/STAT6 étant donné que c'est la voie principale activée par les interleukines 4 et 13 (Omori-Miyake *et al.*, 2014; Schindler *et al.*, 2007). Cette voie a d'abord été analysée suite au traitement par la M β CD comparé au traitement de 48 heures par les interleukines 4 qui a servi de contrôle positif. En effet, les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 0,5, 4, 8 et 24 heures. L'analyse de l'activation de STAT6 a été réalisée par *Western Blot* en comparant l'expression protéique de P-STAT6 (STAT6 phosphorylé) par rapport à celle de STAT6. Aucune phosphorylation de STAT6 n'est observée alors que dans le cas du contrôle positif, l'activation de STAT6 augmente de manière considérable (voir figure 11). Les résultats obtenus suggèrent donc qu'une déplétion en cholestérol au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes et donc une perturbation des microdomaines lipidiques n'a aucun effet sur les voies de signalisation passant par JAK1/STAT6.

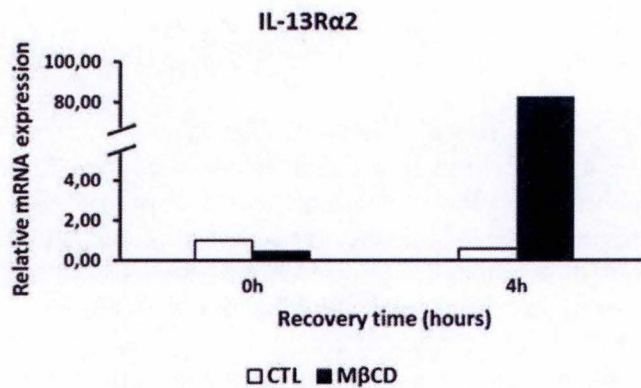


Figure 12: Expression relative en ARNm d'IL-13Rα2.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 et 4 heures. Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans un milieu autocrine. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence (n=1).

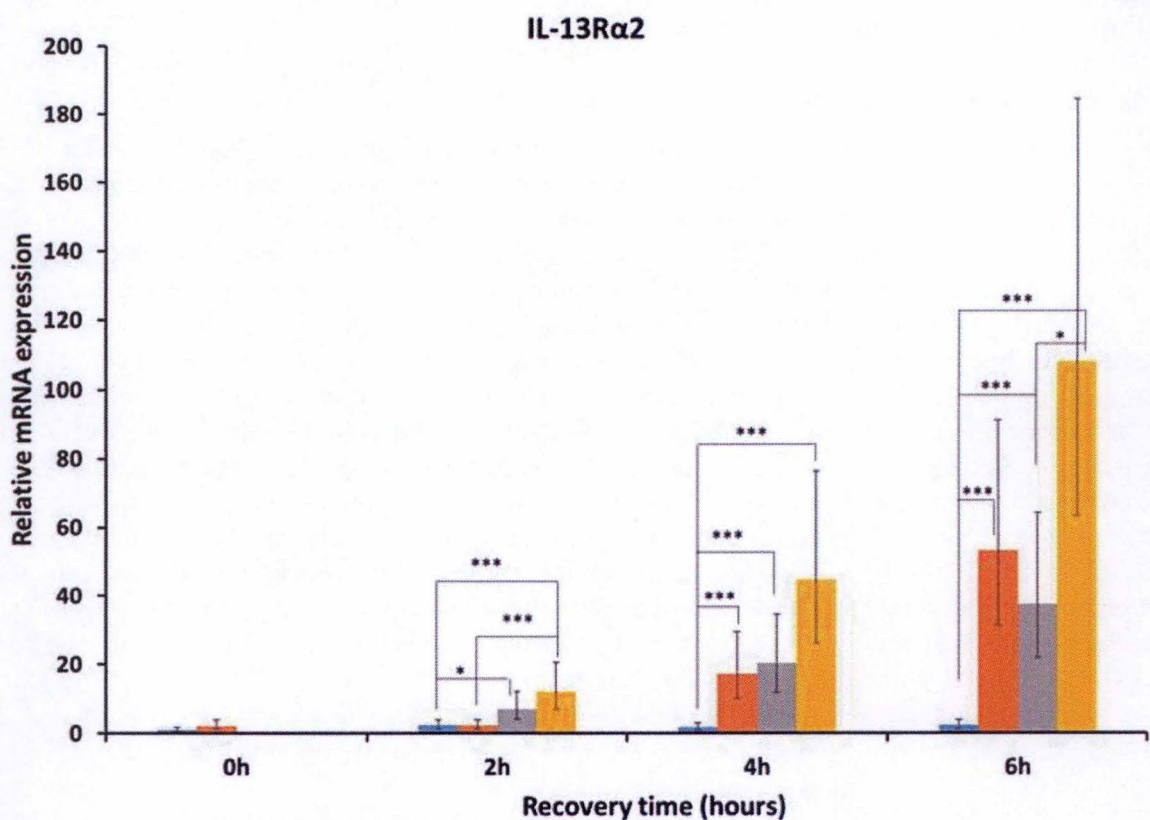


Figure 13: Expression relative en ARNm d'IL-13Rα2.

Les RHE ont été traités à J+11 à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 2, 4 et 6 heures dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25 et dans un milieu normal. Les RHE contrôles non traités à la MβCD ont été incubés dans les mêmes conditions de temps et de milieux. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence. La barre d'erreur représente 95% d'intervalle de confiance (n=3, ANOVA 2 repeated measures, *P<0.05, ***P<0.001).

Régulation du récepteur IL-13R α 2 lors de la perturbation des microdomaines lipidiques par le traitement par la M β CD.

Un autre récepteur est également intéressant à étudier. Il s'agit du récepteur IL-13R α 2 jouant un rôle comme récepteur antagoniste de l'IL-13. Son expression transcriptionnelle et protéique et sa localisation, que ce soit au niveau de cultures de kératinocytes en monocouche ou d'épidermes reconstruits, ont été analysées.

Régulation de l'expression transcriptionnelle

L'expression relative en ARNm a été étudiée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen dans le modèle de culture de kératinocytes en monocouche. Pour ce faire, les cellules ont été traitées à confluence par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 et 4 heures. IL-13R α 2 est faiblement exprimé (Cq élevé) avant et juste après traitement par la M β CD. Néanmoins, une augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 2 est observée dans les cellules traitées par la M β CD après 4 heures de récupération (voir figure 12). Ces résultats confirment ceux obtenus par M. Bourtembourg.

L'expression relative en ARNm de ce récepteur a ensuite été investiguée dans les RHE déplétés en cholestérol et traités par les interleukines 4, 13 et 25. Pour ce faire, les RHE ont été traités à J+11 par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 2, 4 et 6 heures. Pendant la récupération, les RHE ont été incubés d'une part dans un milieu contenant un mix d'interleukines et d'autre part dans le milieu de base.

Après 2 heures de récupération, une augmentation significative de l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 2 est observée dans les cellules traitées par les interleukines et dans celles qui ont subi la combinaison des deux traitements. Par contre, il n'y a pas de différence significative de l'expression relative en ARNm de ce gène dans les cellules traitées par la M β CD et dans les cellules contrôles. De plus, après 4 et 6 heures de récupération, l'expression relative en ARNm de ce récepteur augmente de manière significative dans les cellules traitées par la M β CD, par le mix d'interleukines et par la combinaison des deux traitements (voir figure 13).

Ces résultats démontrent qu'IL-13R α 2 est régulé au niveau transcriptionnel suite à une déplétion en cholestérol de la membrane plasmique des kératinocytes mais également suite à une stimulation par les interleukines 4, 13 et 25.

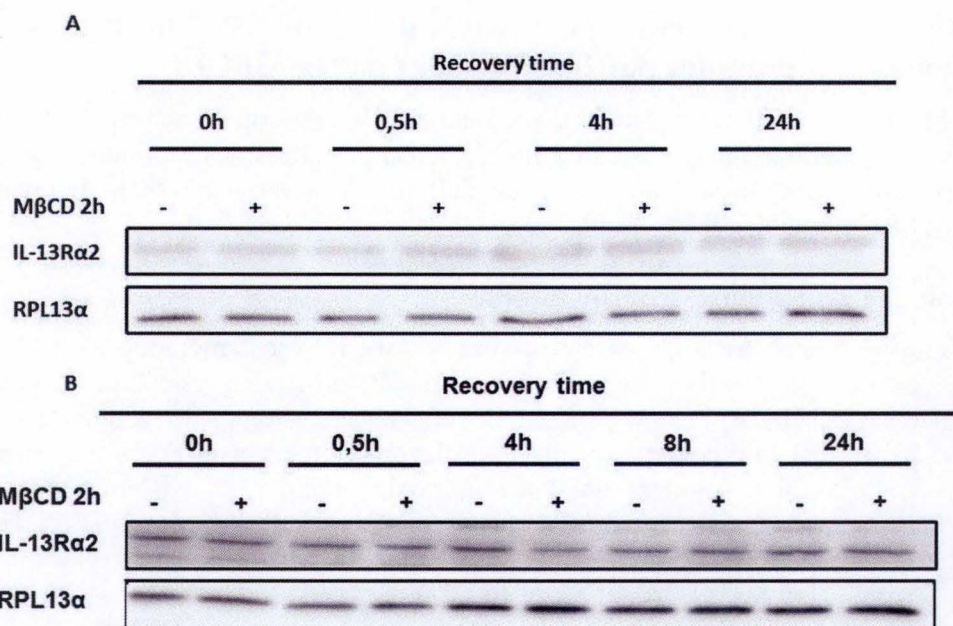


Figure 14: Expression protéique d'IL-13Rα2.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0 heure, 30 minutes et 4 et 24 heures (A) ou avec des temps de récupération de 0 heure, 30 minutes, 4, 8 et 24 heures (B). Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans un milieu autocrine. L'expression protéique a été analysée par Western Blot et RPL13α a été utilisé comme contrôle de charge. Les images montrées sont représentatives de 3 expériences (A) et d'une expérience (B)

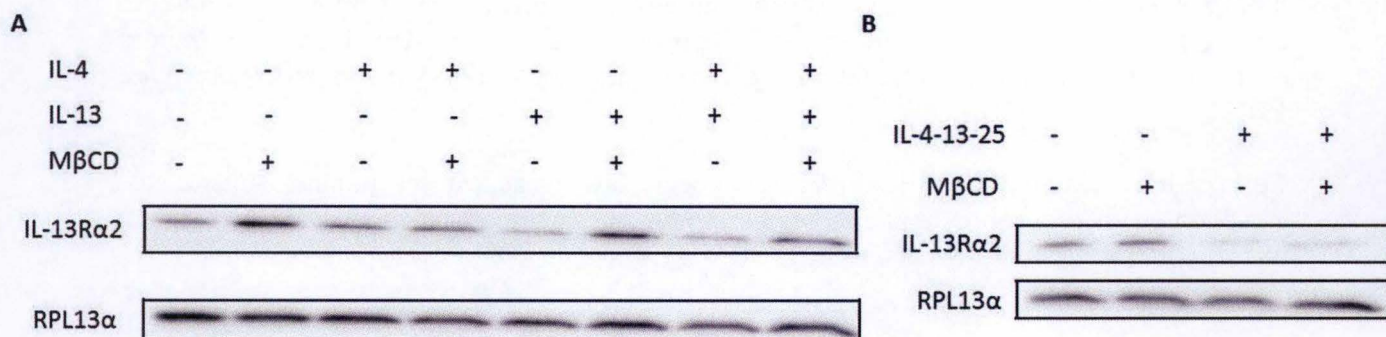


Figure 15: Expression protéique d'IL-13Rα2.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 48 heures dans quatre milieux différent: normal, contenant les IL-4, contenant les IL-13 et contenant une combinaison des deux interleukines. Les cellules contrôles non traitées à la MβCD ont été incubées dans les mêmes conditions de temps et de milieux. (A). Les RHE ont été traités à J+11 à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures. Un temps de récupération de 24 heures a été effectué dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25 et dans un milieu normal (B). L'expression protéique a été analysée par Western Blot et RPL13α a été utilisé comme contrôle de charge. Les images montrées sont représentatives d'une expérience.

Régulation de l'expression protéique

Puisqu'il y a une augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 2 que ce soit dans les cultures de kératinocytes en monocouche et dans les RHE, une analyse de l'expression protéique a été réalisée par *Western Blot* dans le but de confirmer les résultats obtenus par RT-qPCR.

Les cultures de kératinocytes en monocouche ont été traitées à confluence par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 0, 0,5, 4 et 24 heures. L'expression protéique d'IL-13R α 2 est identique dans les cellules traitées et les cellules contrôles (voir figure 14A). Ces résultats ne confirment donc pas ceux obtenus par RT-qPCR. Ceci pourrait être dû soit à un manque de spécificité de l'anticorps, soit à des temps de récupération inadéquats, soit à une dégradation ou un clivage de la protéine produite.

Pour étudier les deux premières hypothèses, l'analyse a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe ci-dessus, mais avec un autre anticorps primaire et un temps de récupération de 8 heures a été ajouté. Malgré ces modifications apportées, aucune différence dans l'expression protéique d'IL-13R α 2 n'est constatée (voir figure 14B).

Pour étudier la dernière hypothèse, des kératinocytes contrôles et des kératinocytes traités à confluence par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures ont été incubés respectivement pendant 48 heures dans quatre milieux différents : contrôle, contenant l'IL-4, contenant l'IL-13 et contenant une combinaison des deux interleukines. Le traitement par les interleukines permet de vérifier si une dégradation ou un clivage de la protéine sont induits. En effet, la littérature montre que l'expression d'IL-13R α 2 augmente suite à une stimulation par ces interleukines (David *et al.*, 2001)). Le but de cette expérience est donc de voir si, dans les conditions traitées par les interleukines, il y a une augmentation de l'expression de cette protéine. De plus, un temps de récupération plus long (48 heures) a été effectué par rapport aux autres expériences permettant d'analyser l'expression protéique après ce temps de récupération. Une augmentation de l'expression protéique d'IL-13R α 2 est observée au niveau des cellules traitées par la M β CD comparée à celle dans les cellules contrôles. De manière étonnante, cette expression diminue dans les cellules traitées par l'IL-13 et celles traitées par la M β CD et par l'IL-13 comparée respectivement à l'expression protéiques dans les cellules contrôles et les cellules traitées par la M β CD. Ce phénomène est également observé dans les cellules traitées par la M β CD et par l'IL-4 par rapport aux cellules traitées par la M β CD (voir figure 15A).

En outre, l'expression de cette protéine a été également investiguée au niveau des RHE traités à J+11 par la M β CD 7,5 mM pendant deux heures et avec un temps de récupération de 24 heures dans un milieu contenant les IL-4, -13 et -25 et dans le milieu de base. L'expression protéique est diminuée dans les RHE traités par ces interleukines par rapport à celle dans les RHE non traités par les interleukines que ce soit avec ou sans traitement par la M β CD. D'autre part, l'expression protéique d'IL-13R α 2 ne varie pas après 24 heures de récupération après traitement par la M β CD, confirmant les données obtenues en monocouche (voir figure 15B).

Les derniers résultats coïncident donc avec ceux de la RT-qPCR, montrant une augmentation de l'expression protéique après 48 heures de récupération après le traitement par la M β CD. Néanmoins, la stimulation des cellules ou des RHE par les interleukines diminue l'expression protéique d'IL-13R α 2.

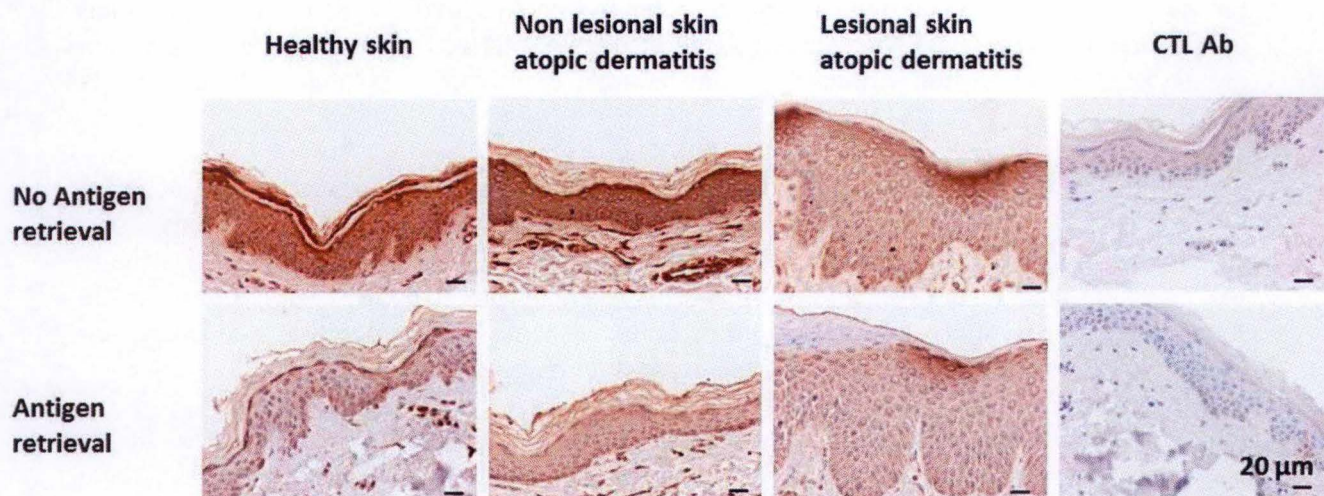


Figure 16: Localisation d'IL-13Ra2

L'immunoperoxydase a été réalisé sur peau saine, sur peau lésionnelle et non lésionnelle de patient atteints dermatite atopique. La condition sans anticorps primaire est le "CTL Ab". Le démasquage a été réalisé ou non. IL-13Ra2 a été révélé en utilisant DAB pendant 30 secondes et les lames ont été visualisées avec le microscope à épifluorescence. La barre d'échelle représente 50 μ m. L'image montrée est représentative d'une expérience.

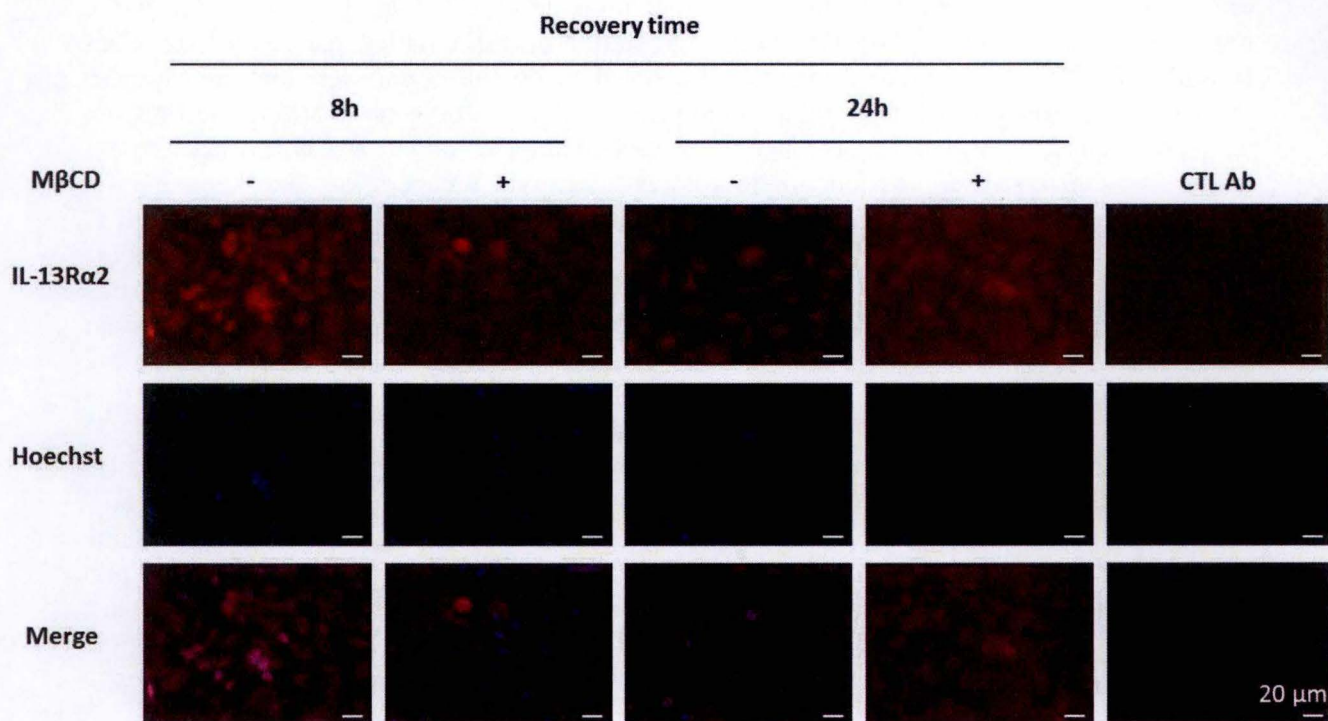


Figure 17: Localisation d'IL-13Ra2 après traitement à la M β CD.

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la M β CD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 8 et 24 heures. Les cellules contrôles non traitées à la M β CD ont été incubées dans le milieu autocrine. La localisation a été analysée par immunofluorescence au microscope à épifluorescence. Les cellules ont été fixées à la PFA et perméabilisées. La condition sans anticorps primaire est le « CTL Ab ». Le noyau a été révélé par le Hoechst et IL-13Ra2 par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué avec l'Alexa 568. La barre de l'échelle représente 20 μ m. L'image montrée est représentative d'une expérience.

Par ailleurs, d'autres analyses sur l'expression protéique d'IL-13R α 2 ont été réalisées par immunomarquage pour analyser la variation de l'expression protéique mais également la localisation du récepteur, que ce soit au niveau des cultures de kératinocytes en monocouche ou au niveau des RHE.

Régulation de la localisation

La localisation d'IL-13R α 2 a été étudiée par immunomarquage réalisé sur des peaux lésionnelles et non lésionnelles de patients atteints de dermatite atopique et sur des peaux de patients sains. Cette expérimentation a également pour but de mettre au point le marquage puisque l'expression relative en ARNm d'IL-13R α 2 est augmentée dans les peaux de dermatite atopique (Lu *et al.*, 2009). Les lames ont été fixées à l'EFA dont certaines ont été démasquées et d'autres non. Le marquage d'IL-13R α 2 a été réalisé par immunoperoxydase (voir figure 16) et par immunofluorescence (résultats non montrés) et les lames ont été visualisées au microscope à épifluorescence. En démasquant ou non et en utilisant différentes gammes de dilution de l'anticorps primaire, une augmentation d'intensité ou aucune variation du marquage sont observées dans les peaux saines et les peaux non lésionnelles comparée à celle dans les peaux lésionnelles. Cependant, les résultats ne correspondent pas à ce qui est publié dans la littérature.

Pour donner suite à cela, plusieurs autres protocoles d'immunomarquage ont été testés en utilisant différentes méthodes de fixation sur des cultures de kératinocytes en monocouche et sur des RHE.

Dans un premier temps, les cultures de kératinocytes en monocouche ont été traitées par la M β CD 7,5 mM pendant deux heures avec des temps de récupération de 8 et 24 heures. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde et certaines ont été perméabilisées et d'autres non. Les lames ont été visualisées au microscope à épifluorescence mais le signal est identique que les cellules aient été traitées ou non, perméabilisées ou non (voir figure 17). Par ailleurs, le deuxième anticorps induit un marquage, visualisé au microscope confocal (résultats non montrés), au niveau nucléaire alors que normalement ce récepteur se trouve au niveau cytoplasmique, membranaire ou encore dans le compartiment extracellulaire (Daines *et al.*, 2006).

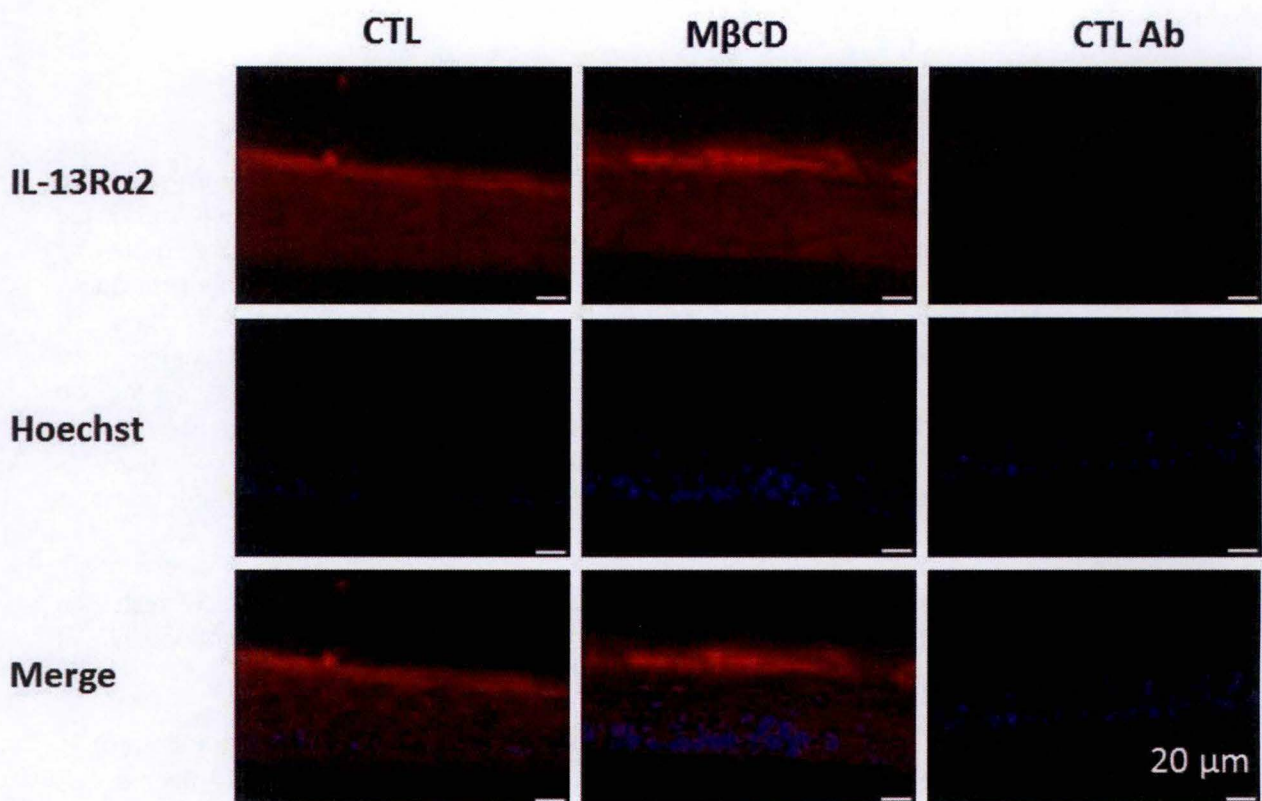


Figure 18: Localisation d'IL-13Rα2 après traitement à la MβCD.

Les RHE ont été traités à J+11 à la MβCD 7.5mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 6 heures. Les RHE contrôles non traités à la MβCD ont été incubés dans un milieu normal pour RHE. La localisation a été analysée par immunofluorescence au microscope à épifluorescence. Les RHE ont été fixés à froid et ensuite à la PFA et perméabilisés. La condition sans anticorps primaire est le « CTL Ab ». Le noyau a été révélé par le Hoechst et IL-13Rα2 par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué avec l'Alexa 568. La barre de l'échelle représente 20μm. L'image montrée est représentative d'une expérience.

Ensuite, les RHE à J+11 ont été traités par la M β CD 7,5 mM pendant deux heures avec un temps de récupération de 6 heures. Les RHE ont été fixés à froid et ensuite soit au méthanol-acétone, soit au paraformaldéhyde et perméabilisés. Les RHE ont été observés au microscope à épifluorescence et le signal est identique dans les RHE traités et dans les non traités. En outre, le marquage est homogène dans ces deux cas (voir figure 18). De plus, le deuxième anticorps marque principalement la lame granuleuse avec une augmentation du signal dans les RHE contrôles par rapport à celui des RHE traités (résultats non montrés).

Tous ces résultats permettent de comprendre la régulation du récepteur lors du traitement par la M β CD, par les interleukines ou par une combinaison des deux traitements. Jusqu'à maintenant la régulation des deux récepteurs des interleukines 4 et 13 a été investiguée aux niveaux transcriptionnel et protéique pour les deux récepteurs et au niveau des voies de signalisation pour le récepteur de type 2. Par contre, dans un premier temps, le récepteur de type 1 constitué d'IL-4R α et d'IL-2R γ n'a pas été étudié du fait que la littérature stipule que ce récepteur n'est présent que dans les cellules hématopoïétiques (Rochman *et al.*, 2009; Tabata and Khurana Hershey, 2007). Cette affirmation n'a jusqu'à maintenant jamais été remise en cause. Or StratiCELL, une entreprise avec laquelle collabore notre laboratoire a réalisé tout récemment une analyse *microarray* de RHE traités par les interleukines 4, 13 et 25 (communication personnelle).

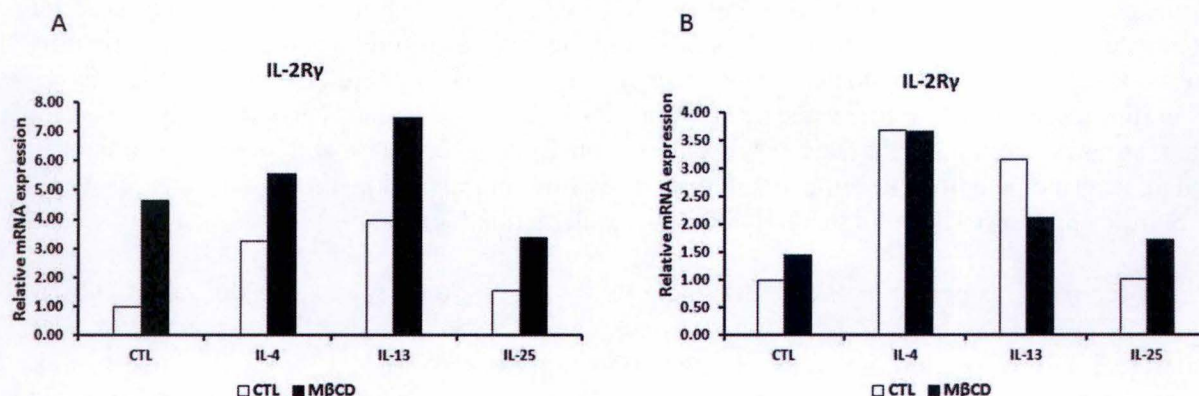


Figure 19: Expression relative en ARNm d'IL-2R γ .

Les kératinocytes en monocouche ont été traités à confluence à la M β CD 7.5mM pendant 2 heures avec des temps de récupération de 24 heures (A) et 48 heures (B) dans quatre milieux différents: autocrine, contenant l'IL-4, contenant l'IL-13 et contenant l'IL-25. Les cellules contrôles non traitées à la M β CD ont été incubées dans les mêmes conditions de temps et de milieux. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence (n=1).

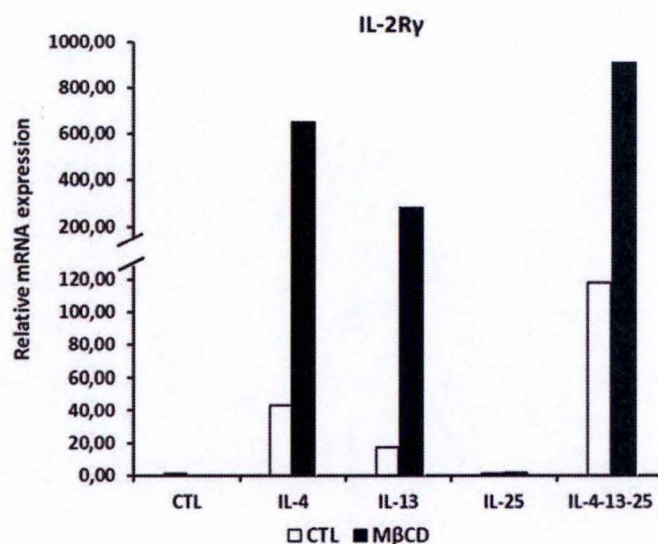


Figure 20: Expression relative en ARNm d'IL-2R γ .

Les RHE ont été traités à J+11 à la M β CD 7.5mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 24 heures dans un milieu contenant cinq milieux différents: normal, contenant l'IL-4, contenant l'IL-13, contenant l'IL-25 et contenant les trois interleukines. Les RHE contrôles non traités à la M β CD ont été incubés dans les mêmes conditions de temps et de milieux. L'expression relative en ARNm a été analysée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen et RPLP0 a été utilisé comme gène de référence (n=2).

Régulation de la sous-unité IL-2R γ lors d'une condition inflammatoire dans les kératinocytes humains

Le *microarray* a été réalisé sur des RHE traités par les interleukines 4, 13 et 25 pendant 48 heures et, contre toute attente, une augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-2R γ de 11 fois est observée alors que ces RHE ne sont constitués que de kératinocytes (communication personnelle). Ce résultat suggère donc qu'en cas d'inflammation, les kératinocytes exprimeraient le récepteur de type 1, phénomène qui n'avait jamais été observé auparavant. C'est pourquoi la suite de mon travail porte sur la régulation d'IL-2R γ d'un point de vue transcriptionnel et protéique que ce soit dans un modèle de kératinocytes en monocouche ou au niveau des RHE traités par les différentes interleukines séparées ou combinées. Par ailleurs, ces modèles ont été traités par la M β CD dans le but d'étudier une possible régulation de cette sous-unité du récepteur par les microdomaines lipidiques.

Régulation de l'expression transcriptionnelle

Dans un premier temps, l'expression relative en ARNm d'IL-2R γ a été investiguée par RT-qPCR avec la méthode SYBRGreen dans le but de confirmer les résultats du *microarray* réalisé par StratiCELL. Les cultures de kératinocytes en monocouche à confluence ont été traitées par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures et avec temps de récupération de 24 et 48 heures dans quatre milieux différents : contrôle, contenant des interleukines 4, contenant des interleukines 13 et contenant des interleukines 25.

Après 24 heures de récupération, une augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-2R γ est observée dans les cellules traitées par la M β CD. Toutefois, vu les Cq élevés (33-35), cette sous-unité est faiblement exprimée. D'autre part, une augmentation de cette expression est observée dans les cellules traitées par les interleukines 4 et 13. Par ailleurs, l'interleukine 25 ne semble pas réguler l'expression transcriptionnelle d'IL-2R γ . Cette observation est également constatée lorsqu'on traite d'abord ces cellules par la M β CD (voir figure 19A).

Après 48 heures de récupération, l'expression relative en ARNm d'IL-2R γ est augmentée dans les cellules traitées par les interleukines 4 et dans celles traitées par les interleukines 13. En revanche, aucune augmentation de cette expression n'est observée dans les cellules traitées par les interleukines 25. De plus, aucune différence d'expression transcriptionnelle dans les cellules traitées par la M β CD et les cellules contrôles n'est constatée (voir figure 19B).

Après analyse sur les cultures de kératinocytes en monocouche, l'expression transcriptionnelle a été analysée sur des RHE, modèles utilisés également par StratiCELL. Les RHE ont été traités à J+11 par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 24 heures dans cinq milieux différents : contrôle, contenant l'IL-4, contenant l'IL-13, contenant l'IL-25 et contenant une combinaison des trois interleukines. Les RHE contrôles ont été incubés dans les mêmes conditions de temps et de milieux. Une augmentation de l'expression relative en ARNm d'IL-2R γ est observée dans les RHE traités par les interleukines 4 et dans ceux traités par les interleukines 13. Cette expression est plus élevée dans les RHE traités par la combinaison des trois interleukines. Comme pour les cultures de kératinocytes en monocouche, aucune variation de l'expression transcriptionnelle n'est remarquée après le traitement par les interleukines 25. En outre, le traitement par la M β CD seul n'a aucun effet sur la régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-2R γ mais la combinaison du traitement par l'IL-4, par l'IL-13 et par les trois interleukines avec celui par la M β CD engendre une réponse plus élevée en comparaison avec les RHE non traités par la M β CD (voir figure 20).

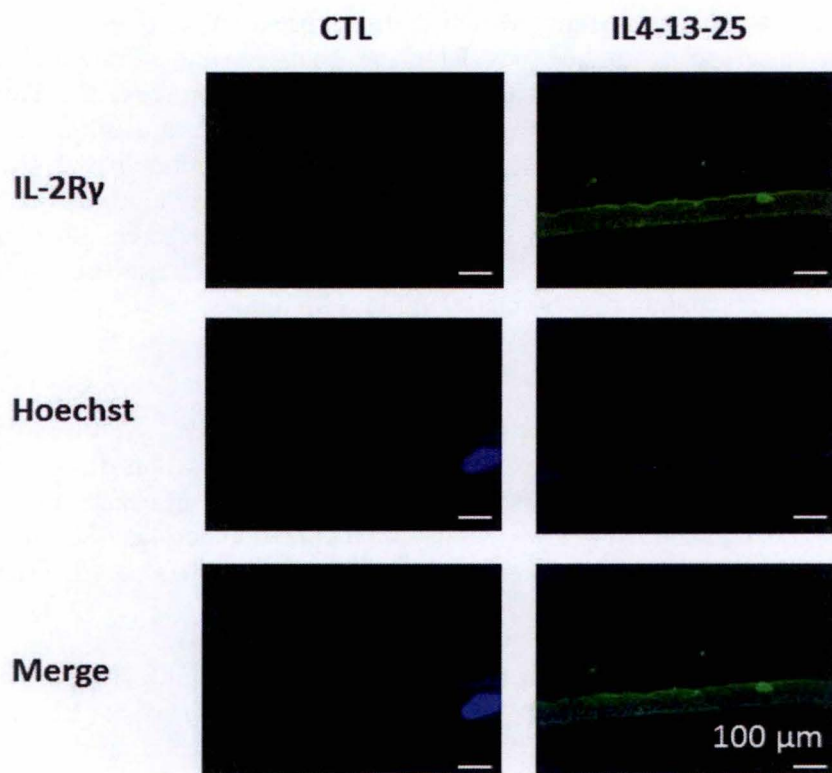


Figure 21: Localisation d'IL-2R γ après traitement à la M β CD.

Les RHE ont été traités à J+11 avec un mix d'interleukines 4, 13 et 25 pendant 24 heures. Les cellules contrôles non traitées aux interleukines ont été incubées dans un milieu normal. La localisation a été analysée par immunofluorescence au microscope à épifluorescence. Les RHE, fixés à l'EFA, ont été enrobés dans la paraffine et ont été démasqués. Le noyau a été révélé par le Hoechst et IL-2R γ par un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire conjugué avec l'Alexa 488. La barre de l'échelle représente 100 μ m. L'image montrée est représentative d'une expérience.

Ces résultats suggèrent donc une augmentation de la transcription en ARNm du gène d'IL-2R γ en culture de kératinocytes en monocouche et encore plus importante dans les RHE. Pour rappel, ces deux modèles ne contiennent que des kératinocytes et donc la transcription de ce gène est réalisée dans ces cellules.

Régulation de l'expression protéique

L'expression protéique d'IL-2R γ a été analysée par *Western Blot* sur des kératinocytes traités à confluence par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 48 heures dans quatre milieux différents : contrôle, contenant des interleukines 4, contenant des interleukines 13 et contenant une combinaison de ces deux cytokines. L'analyse protéique a également été effectuée sur des RHE traités à J+11 par la M β CD avec un temps de récupération de 24 heures dans le milieu de base et dans un milieu contenant les IL-4, -13 et -25. Malheureusement, aucune bande au niveau du poids moléculaire d'IL-2R γ n'est apparue sur la membrane. Ce fait pourrait être dû à une mauvaise spécificité de l'anticorps primaire pour l'analyse protéique d'IL-2R γ avec la méthode *Western Blot*.

Régulation de la localisation

L'expression protéique de cette sous-unité du récepteur a également été étudiée en immunofluorescence. Grâce à cela, une étude de la localisation a été réalisée.

Ce marquage a été d'abord réalisé sur des cultures de kératinocytes en monocouche traitées à confluence par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures avec un temps de récupération de 48 heures dans quatre milieux différents : contrôle, contenant des interleukines 4, contenant des interleukines 13 et contenant une combinaison de ces deux interleukines. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde et perméabilisées. Malheureusement, aucun marquage n'est observé. Suite à ce résultat et celui du *Western Blot*, trois hypothèses peuvent être avancées. La première est que le gène d'IL-2R γ serait transcrit mais pas traduit en protéines. La deuxième est que l'anticorps ne serait pas spécifique pour cette protéine. La dernière hypothèse est que les conditions de marquage pourraient être inadéquates. De ce fait, d'autres analyses de marquage ont été réalisées.

Pour ce faire, une mise au point du marquage a été effectuée sur des RHE traités à J+11 par les interleukines 4, 13 et 25 pendant 48 heures et ensuite fixés à l'EFA et enrobés en paraffine. L'immunomarquage d'IL-2R γ des RHE traités a été comparé à celui des RHE non traités par les interleukines. Les RHE ont subi, dès lors, soit un démasquage et une perméabilisation, soit seulement un démasquage soit seulement une perméabilisation soit encore aucune des deux manipulations. Par contre, des résultats différents d'un point de vue de l'intensité et la localisation du signal ont été observés avec les différentes conditions. Nous avons donc choisi de ne présenter que les résultats (voir figure 21) qui coïncident avec les résultats de la RT-qPCR c'est-à-dire la condition démasquée et non perméabilisée. Néanmoins, il est utile de réitérer cette expérience et de valider la spécificité de l'anticorps primaire.

DISCUSSION

DISCUSSION

Ce mémoire a pour objet l'analyse de la régulation des récepteurs aux interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les kératinocytes humains. Ce projet fait suite à la thèse d'Evelyn De Vuyst, démontrant une réponse additive du traitement par la M β CD, molécule capable de désorganiser les microdomaines lipidiques, et du traitement par les interleukines sur les kératinocytes (De Vuyst, 2016). En outre, un *microarray* réalisé sur les cultures de kératinocytes en monocouche traitées par la M β CD rapporte une augmentation élevée de l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 2 et moindre de celles d'IL-4R α et d'IL-13R α 1 (Mathay *et al.*, 2011). Tous ces résultats suggèrent donc que les récepteurs aux interleukines 4 et 13 seraient régulés par les microdomaines lipidiques.

Ces récepteurs ont été étudiés dans deux modèles différents : le modèle en culture de kératinocytes en monocouche et le modèle d'épiderme humain reconstruit. Ces deux modèles ont été traités par la M β CD 7,5 mM pendant 2 heures et analysés après différents timings de récupération, réalisés dans le milieu de base et dans un milieu contenant les interleukines 4, 13 et 25.

Dans un premier temps, le modèle en culture de kératinocytes en monocouche traités par la M β CD a été validé aux niveaux morphologique et transcriptionnel dans le but de vérifier que ce travail se réalise sur de bonnes bases.

Les kératinocytes traités par la M β CD présentent une altération de la morphologie à 0 et 0,5 heures de récupération avec des espaces intercellulaires plus larges (voir figure 1). Cette modification de la morphologie après traitement des kératinocytes est également décrite dans la littérature (Jans *et al.*, 2004). Par ailleurs, après 4 heures de récupération, les kératinocytes ont retrouvé leur morphologie de base grâce à leur capacité à synthétiser eux-mêmes le cholestérol (Giltair *et al.*, 2011).

L'analyse transcriptionnelle a été réalisée sur deux gènes, l'HB-EGF et l'IL-8. Une augmentation de l'expression relative en ARNm de ces deux gènes est observée juste après traitement et après 4 heures de récupération (voir figure 2). Ces résultats corroborent les résultats obtenus par le *microarray* (Mathay *et al.*, 2011) et ceux obtenus par M. Bourtembourg qui rapporte une augmentation de l'expression relative en ARNm de ces deux gènes lors d'une déplétion en cholestérol de la membrane plasmique des kératinocytes (Bourtembourg, 2016). De plus, l'expression transcriptionnelle de ces deux gènes est augmentée dans les peaux lésionnelles de dermatite atopique comparée à celle dans les peaux saines (Mathay *et al.*, 2011). En outre, HB-EGF a été analysé, dans des études antérieures, dans les RHE traités par la M β CD. En effet, Giltair et ses collègues ont rapporté que le traitement des RHE par la M β CD induit une augmentation d'ATP extracellulaire. Cela active de manière ligand-indépendant EGFR qui active lui-même ERK1/2 et P-38. Ensemble ou séparément, ces deux protéines vont induire une augmentation de l'expression transcriptionnelle de l'HB-EGF confirmant les résultats obtenus dans ce mémoire (Giltair *et al.*, 2011).

Ces résultats prouvent que le modèle est adéquat pour continuer le projet et donc étudier les récepteurs aux interleukines 4 et 13.

La régulation des sous-unités IL-4R α et IL-13R α 1 du récepteur de type 2 aux interleukines 4 et 13.

Dans un premier temps, la régulation de l'expression transcriptionnelle et protéique d'IL-13R α 1 et d'IL-4R α a été investiguée dans le but de confirmer les résultats obtenus par le *microarray*. Le *microarray* est une technique intéressante pour l'étude de la transcription simultanée de nombreux gènes. Néanmoins, cette technique étant moins précise que la RT-qPCR qui permet l'étude de la transcription d'un seul gène, les résultats obtenus doivent être confirmés par RT-qPCR.

L'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 1 est augmentée de manière significative dans les RHE traités par la M β CD après 4 heures et 6 heures de récupération comparée à celle dans les RHE contrôles (voir figure 3). Cette augmentation n'est pas observée dans les cultures de kératinocytes en monocouche (Bourtembourg, 2016). Ceci peut s'expliquer par le fait que le modèle en monocouche est un modèle plus simplifié ne contenant ni stratification ni barrière épidermique. De plus, dans les RHE traités par la M β CD combinés à une stimulation par les interleukines 4, 13 et 25, l'expression transcriptionnelle de ce gène est augmentée de manière significative (voir figure 3).

M. Bourtembourg, dans le cadre de son mémoire, a étudié **l'expression protéique d'IL-13R α 1** en *Western Blot*. Malheureusement aucune bande au niveau du poids moléculaire d'IL-13R α 1 n'a été visualisée sur la membrane (Bourtembourg, 2016). Il serait donc intéressant de recommencer cette expérience avec un autre anticorps primaire dans le but de confirmer les résultats obtenus par RT-qPCR.

L'expression transcriptionnelle d'IL-4R α est la même dans les kératinocytes cultivés en monocouche traités par la M β CD et dans les kératinocytes contrôles (voir figure 4). Par ailleurs aucune variation de l'expression relative en ARNm de ce gène n'est observée dans les RHE contrôles, dans les RHE traités par la M β CD, dans les RHE traités par les interleukines et dans les RHE traités par la combinaison des deux traitements (voir figure 5).

Une analyse de **l'expression protéique d'IL-4R α** a ensuite été réalisée par *Western Blot* afin de confirmer les analyses obtenues par RT-qPCR. L'expression protéique d'IL-4R α reste identique dans les kératinocytes traités par la M β CD et dans les kératinocytes contrôles ce qui coïncide avec les résultats de la RT-qPCR. Par contre, l'analyse de cette sous-unité en immunofluorescence rapporte une augmentation du signal dans les cellules traitées par la M β CD par rapport au signal dans les cellules contrôles suggérant donc une augmentation de la production de la protéine (Bourtembourg, 2016).

L'expression relative en ARNm d'IL-4R α et d'IL-13R α 1 dans les kératinocytes cultivés en monocouche ne corroborent donc pas les résultats obtenus par le *microarray*. De plus les interleukines seules ne modifient pas l'expression transcriptionnelle de ces gènes contrairement à ce qui est observé dans d'autres cellules. En effet dans les lymphocytes T, l'IL-4 induit la transcription d'IL-4R α et dans les monocytes, l'IL-4 avec l'aide de l'IL-13 diminue l'expression transcriptionnelle des deux sous-unités du récepteur de type 2 (David *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'analyse protéique d'IL-4R α par *Western Blot* et par immunomarquage avec le même anticorps primaire donne deux résultats différents suggérant donc un manque de spécificité de l'anticorps. Cet anticorps a donc été analysé dans ce travail afin de valider sa spécificité.

L'analyse de la spécificité de l'anticorps anti-IL-4R α a été réalisée par transfection des kératinocytes par des siARN dirigés contre l'ARNm d'IL-4R α . Le signal obtenu par immunofluorescence diminue dans les kératinocytes transfectés démontrant que l'anticorps est spécifique en immunomarquage (voir figure 7). Par contre, ceci ne veut pas dire que l'anticorps est spécifique en *Western Blot*. En effet, en *Western Blot*, la protéine est dénaturée, événement qui n'est pas réalisé en immunomarquage et donc l'accès à l'antigène reconnu par l'anticorps est modifié. Malheureusement, l'analyse protéique en *Western Blot* n'a pu être réalisée correctement par manque de matériel. Il serait donc nécessaire de recommencer cette expérience en changeant le protocole pour obtenir assez de protéines.

De plus, lors de cette expérience, deux contrôles ont été ajoutés. Dans le premier, les cellules ont subi l'électroporation sans siARN et dans le deuxième, les cellules ont été transfectées par des siARN NT. La validation de la transfection par RT-qPCR rapporte une diminution de plus de 50% de l'expression transcriptionnelle d'IL-4R α dans les kératinocytes, 24 heures après la transfection de ceux-ci par les siARN NT (voir figure 6). Cette diminution a été confirmée en immunomarquage (voir figure 7). Ceci peut être dû à un effet du siARN NT sur l'expression transcriptionnelle de ce gène soit par une liaison directe à l'ARNm d'IL-4R α pour le dégrader, soit indirectement par une diminution de l'expression transcriptionnelle d'un autre gène. En effet, une étude a été réalisée sur ce siARN NT montrant une modification de l'expression transcriptionnelle de 17 gènes différents dont aucun ne correspond à celui qui code pour IL-4R α (Baum *et al.*, 2010). En outre, certains auteurs ont observé une diminution de l'expression transcriptionnelle d'EGFR en utilisant ce siARN NT. Ces observations et le fait que l'entreprise propose plusieurs siARN NT différents, laisse supposer que cette hypothèse est la plus probable.

De ce fait, les cellules ont été transfectées avec un autre siARN NT. L'analyse de l'expression protéique d'IL-4R α en immunofluorescence rapporte que le signal observé dans les kératinocytes transfectés par les siARN NT est le même que dans les kératinocytes contrôles (voir figure 7). Par contre, aucune analyse aux niveaux transcriptionnel et protéique, respectivement par RT-qPCR et par *Western Blot* n'a pu être réalisée par manque de matériel dû à une mort cellulaire trop élevée. Comme pour l'analyse protéique en *Western Blot* lors de la première expérience, il serait intéressant de recommencer cette expérience avec des changements dans le protocole.

La spécificité de l'anticorps en immunomarquage étant validée, **la régulation de la localisation d'IL-4R α** a été étudiée. Dans un premier temps, l'immunomarquage réalisée par M. Bourtembourg (Bourtembourg, 2016) suggérant une augmentation de la production d'IL-4R α après traitement par la M β CD a été reproduite dans ce mémoire. Cette expérience permet également d'investiguer la localisation d'IL-4R α . Aucune différence de signal entre les kératinocytes déplétés en cholestérol et les kératinocytes contrôles n'est observée dans les cellules perméabilisées, ne correspondant pas avec les résultats obtenus par M. Bourtembourg (voir figure 9). De plus, un changement de la localisation d'IL-4R α est observé dans les kératinocytes déplétés en cholestérol. En effet, une migration vers la membrane plasmique est suggérée lors d'une récupération de 30 minutes après traitement par la M β CD (voir figure 9). Les microdomaines lipidiques pourraient donc réguler la localisation de cette sous-unité. Étant donné que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois dans ce mémoire, et que des résultats différents de ceux de M. Bourtembourg sont obtenus, il serait donc intéressant de la recommencer.

Suite aux résultats obtenus dans le paragraphe précédent, la localisation d'IL-4R α est analysée dans les microdomaines pour savoir si ces microdomaines la régulent directement. Ceci a été réalisé en marquant les sphingomyélines en rouge par la sonde lysénine-mCherry et IL-4R α avec un système d'anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome vert. Néanmoins aucune localisation d'IL-4R α n'est trouvée dans les microdomaines lipidiques de kératinocytes traités par les interleukines 4 et de kératinocytes contrôles (voir figure 10). Toutefois, il serait intéressant d'analyser la localisation de cette sous-unité par centrifugation par gradient de sucrose dans le but de confirmer ce résultat. Cependant, cette expérience n'a pu être réalisée dû à une incertitude de la spécificité de l'anticorps anti-IL-4R α en *Western Blot*. Toutefois, si après cette expérience, IL-4R α n'est toujours pas retrouvé dans les microdomaines, ceci suggérerait que les récepteurs de type 2 sont régulés par une autre voie de signalisation activée par un autre récepteur régulé par ces microdomaines.

La localisation d'IL-4R α au niveau des endosomes corticaux a également été analysée dans les kératinocytes traités par les interleukines 4 pendant 14 heures suite à ce qui a été observé dans la littérature au niveau des cellules du rein (Gandhi *et al.*, 2014; Kurgonaite *et al.*, 2015). Une internalisation d'IL-4R α , après liaison au ligand est observée dans les kératinocytes mais son internalisation ne se fait pas dans les endosomes corticaux comme observé dans les cellules du rein (voir figure 8). IL-4R α peut être internalisé soit dans d'autres endosomes tels que les endosomes précoces ou tardifs, soit dans des vésicules à clathrine ou à cavéoline. De plus, il serait nécessaire d'étudier le mode d'internalisation d'IL-4R α .

Après analyse de la régulation de l'expression du récepteur de type 2 des interleukines 4 et 13, **la régulation d'une activation des voies de signalisation** de ce récepteur par les microdomaines lipidiques a été étudiée. Cette activation a été analysée par la phosphorylation de STAT6, voie majeure activée par ce récepteur (Omori-Miyake *et al.*, 2014; Schindler *et al.*, 2007). Aucune phosphorylation de STAT6 n'est observée au niveau des cultures de kératinocytes en monocouche et des RHE, tous deux déplétés en cholestérol (voir figure 11). Ceci démontre que l'activation des récepteurs par une désorganisation des microdomaines lipidiques ne se passe pas par JAK1/STAT6. Cependant, la combinaison du traitement par la M β CD et par les interleukines 4 pourrait engendrer une réponse synergique. M. Bourtembourg a analysé cette possible réponse synergique sur des RHE mais le même taux de phosphorylation de STAT6 est observé dans les RHE traités par la combinaison des deux traitements et les RHE traités seulement par l'IL-4 (Bourtembourg, 2016). Néanmoins, d'autres voies de signalisation activées par ce récepteur après une déplétion en cholestérol et sans stimulation par les interleukines 4 et 13 peuvent être induites telles que la voie de TYK2/STAT3. De, plus, la littérature a démontré que les voies d'ERK et de P38 sont activées par l'IL-4 et l'IL-13 dans les kératinocytes (David *et al.*, 2001). Par ailleurs, plusieurs études ont rapportées une augmentation de l'activation d'ERK et P-38 par l'EGFR lors d'une désorganisation des microdomaines lipidiques (Giltaire *et al.*, 2011; Jans *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2006; Mathay *et al.*, 2008; Mathay and Poumay, 2010). Il serait donc également intéressant d'étudier l'activation de ces voies par le récepteur de type 1 des interleukines 4 et 13 dans le cas d'une déplétion en cholestérol des cultures de kératinocytes en monocouche et des RHE.

La régulation du récepteur IL-13R α 2

Après analyse d'IL-4R α et d'IL-13R α 1, une étude sur le récepteur IL-13R α 2 a été réalisée.

Dans un premier temps, **la régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 2** a été investiguée dans les kératinocytes déplétés en cholestérol. L'expression transcriptionnelle de ce gène est augmentée après 4 heures de récupération après traitement par la M β CD (voir figure 12). Ces résultats confirment donc ceux obtenus avec le *microarray* réalisé sur les cultures de kératinocytes traités par la M β CD (Mathay *et al.*, 2011) et ceux obtenus de M. Bourtembourg (Bourtembourg, 2016).

Au niveau des RHE déplétés en cholestérol, l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 2 est augmentée après 4 et 6 heures de récupération après traitement (voir figure 13), ce qui confirme les résultats obtenus dans les cultures de kératinocytes en monocouche. De plus, dans les mêmes conditions de temps de récupération, l'expression transcriptionnelle est augmentée dans les RHE traités par les interleukines et dans ceux traités par la combinaison des deux traitements (voir figure 13).

Ces observations démontrent une régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 2 par les interleukines et par les microdomaines lipidiques mais aucune réponse synergique entre les deux traitements ne semble être induite. Néanmoins, ces deux traitements semblent engendrer un effet additif de l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 2. Dans la littérature, il a également été montré que les interleukines 4 et 13 jouent un rôle dans la régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-13R α 2 dans les kératinocytes (David *et al.*, 2001). Il serait, dès lors intéressant d'analyser cette régulation par les trois interleukines séparément dans le but de visualiser quelle interleukine a un effet comme cela a été fait pour l'étude de l'expression protéique en *Western Blot*.

L'analyse de la **régulation de l'expression protéique** a été investiguée dans le but de confirmer les résultats de la RT-qPCR. L'expression de la protéine augmente après 48 heures de récupération après traitement par la M β CD en culture de kératinocytes en monocouche (voir figure 15). Ces résultats confirment donc ceux obtenus en RT-qPCR. Il serait donc nécessaire d'observer l'expression protéique dans les RHE traités par la M β CD après un timing plus long, 48 heures de récupération dans le but de voir si l'expression en protéines d'IL-13R α 2 augmente également car il semblerait que 24 heures de récupération ne soient pas suffisantes pour l'observation de variation d'expression protéique (voir figure 15).

De plus, le traitement des cellules par l'IL-13 semble induire une diminution de l'expression protéique d'IL-13R α 2 au niveau des cellules traitées par la M β CD et au niveau des cellules contrôles. Le même phénomène est observé dans les RHE traités par les interleukines 4, 13 et 25. Par ailleurs, le traitement par l'IL-4 semble induire une diminution de cette expression uniquement dans les cellules traitées par la M β CD (voir figure 15). Ceci peut être expliqué par deux hypothèses.

La première est qu'une augmentation du clivage d'IL-13R α 2 est réalisée dans le but de produire une protéine soluble. Une étude a démontré que le taux de distribution entre le compartiment intracellulaire, la membrane et le compartiment extracellulaire ne varie pas en fonction de la concentration totale de ce récepteur (Daines *et al.*, 2006). Néanmoins, dans des conditions inflammatoires, la présence de l'IL-4 et de l'IL-13 pourrait induire une augmentation du clivage

de la protéine et donc une augmentation du taux de cette protéine dans le domaine extracellulaire. En effet, Chen et ses collègues ont prouvé qu'un clivage de cette protéine est réalisé par la métalloprotéinase (MMP)-8 (Chen *et al.*, 2008). De plus d'autres études ont démontré que l'IL-13 et l'IL-4 induisent une augmentation de l'expression de plusieurs MMP telles que la MMP-7 et la MMP-3 mais l'augmentation de la MMP-8 par l'IL-13 n'a pas été analysée (Wadsworth *et al.*, 2010). De ce fait, il serait utile d'analyser la présence d'IL-13R α 2 soluble par clivage d'IL-13R α 2 membranaire par la MMP-8 et si une augmentation de la MMP-8 est induite par l'IL-13 et l'IL-4.

La deuxième hypothèse postulerait que le récepteur, une fois lié à l'IL-13 ou IL-4R α , serait endocyté et dégradé rapidement, soit par les lysosomes, soit par le protéasome.

En outre, le fait que l'IL-4 induit une diminution de l'expression protéique d'IL-13R α 2 uniquement dans les cellules déplétées en cholestérol suggère que le clivage ou la dégradation de ce récepteur induit par l'IL-4, est régulé par les microdomaines lipidiques.

La régulation de localisation d'IL-13R α 2 a été investiguée dans les cultures de kératinocytes en monocouche, dans les RHE et dans les peaux de dermatite atopique en immunomarquage. Malheureusement, les deux anticorps primaires utilisés ne semblent pas spécifiques étant donné que les résultats obtenus ne sont pas cohérents avec ceux obtenus dans la littérature. En effet, dans les peaux lésionnelles de dermatite atopique, une augmentation de l'expression en ARNm d'IL-13R α 2 est démontrée (Lu *et al.*, 2009), alors que l'immunomarquage réalisé dans ce mémoire rapporte que l'expression protéique est la même ou diminue en fonction du démasquage (voir figure 16).

L'immunofluorescence au niveau des kératinocytes cultivés en monocouche et des RHE induit un signal qui ne diffère pas entre les conditions traitées et les conditions contrôles (voir figure 17 et 18). Mais il serait intéressant de réaliser le marquage au niveau des kératinocytes cultivés en monocouche et des RHE après 48 heures de récupération après traitement par la M β CD, puisqu'une augmentation de l'expression protéique est observée à ce temps de récupération en *Western Blot*.

La localisation de ce récepteur semble homogène, que ce soit dans les kératinocytes ou dans les RHE. Mais aucune conclusion ne peut être avancée, soit à cause d'un manque de spécificité de l'anticorps, soit à cause de conditions de protocole inadéquates.

La régulation de la sous-unité IL-2R γ du récepteur de type 1 aux interleukines 4.

Une dernière sous-unité des récepteurs aux interleukines 4 a été analysée, à savoir IL-2R γ , même si la littérature assure que cette sous-unité ne se trouve pas dans les cellules non hématopoïétiques (Rochman *et al.*, 2009; Tabata and Khurana Hershey, 2007). En effet, le *microarray* réalisé par StratiCELL sur des épidermes reconstruits remet en cause cette affirmation.

Dans un premier, **la régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-2R γ** a été investiguée dans le but de confirmer les résultats obtenus par le *microarray* de StratiCELL.

L'expression relative en ARNm d'IL-2R γ augmente dans les kératinocytes cultivés en monocouche après 24 heures de récupération après traitement par la M β CD. Cette augmentation est également retrouvée après traitement de 24 heures par les interleukines 4 et par les interleukines 13. Néanmoins, l'IL-25 semble ne jouer aucun rôle dans la régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-2R γ (voir figure 19).

De plus, IL-2R γ est plus exprimé dans les RHE que dans les cultures de kératinocytes en monocouche, tous deux stimulés par les interleukines, ce qui est probablement dû à une localisation d'IL-2R γ dans les couches supérieures de l'épiderme. Par ailleurs, la combinaison des traitements par la M β CD et par les interleukines augmente l'expression relative en ARNm d'IL-2R γ par rapport aux traitements séparés (voir figure 20). Les résultats suggèrent une réponse synergique des deux traitements combinés. Etant donné que cette expérience n'a été réalisée que deux fois, il serait intéressant de la répéter.

Tous ces résultats suggèrent plusieurs éléments qui n'ont pas encore été montré dans la littérature voire même se sont trouvés niés par celle-ci (Rochman *et al.*, 2009; Tabata and Khurana Hershey, 2007). Premièrement les kératinocytes semblent exprimer faiblement la sous-unité de récepteur, l'IL-2R γ . Par contre, dans des conditions de déplétion de cholestérol de la membrane plasmique et dans des conditions inflammatoires, son expression augmente.

Ensuite, l'expression transcriptionnelle d'IL-2R γ semble être régulée par les interleukines 4 et 13. Au contraire, jusqu'à présent la littérature rapporte que l'expression de l'IL-4 et de l'IL-13 serait régulée par le récepteur de type 1 de l'IL-4 ou le récepteur de l'IL-2 dans les lymphocytes T (Zhu, 2015), ces deux récepteurs contenant la sous-unité IL-2R γ (Rochman *et al.*, 2009).

Enfin, les microdomaines lipidiques semblent jouer un rôle dans la régulation de l'expression transcriptionnelle d'IL-2R γ suggérant que cette sous-unité se trouve dans ces microdomaines. Néanmoins, la localisation d'IL-2R γ dans les microdomaines lipidiques a déjà été étudiée précédemment (Marmor and Julius, 2001). Cette étude a été réalisée dans les lymphocytes T et rapporte que cette sous-unité ne se trouve pas dans les microdomaines lipidiques. Néanmoins, IL-2R α se situe dans ces microdomaines. IL-2R α est une sous-unité du récepteur de l'IL-2, formé par IL-2R α , IL-2R β et IL-2R γ . Toutefois, la trimérisation se produit hors des microdomaines (Marmor and Julius, 2001). Cependant, il serait intéressant d'étudier la localisation d'IL-2R γ dans les microdomaines lipidiques des kératinocytes humains.

L'expression protéique d'IL-2R γ a été étudiée dans le but de confirmer les résultats obtenus avec la RT-qPCR. Le *Western Blot* réalisé dans ce travail ne révèle malheureusement aucune

bande au niveau du poids moléculaire attendu d'IL-2R γ suggérant une mauvaise spécificité de l'anticorps en *Western Blot*. D'autres analyses doivent donc être réalisées avec un autre anticorps primaire. De plus, un contrôle positif serait nécessaire. Ce contrôle peut être l'expression protéique d'IL-2R γ dans les lymphocytes T étant donné que cette sous-unité du récepteur est fortement exprimée dans ces cellules (Rochman *et al.*, 2009).

Néanmoins, l'immunomarquage suggère une augmentation de l'expression protéique dans les RHE traités par les interleukines 4, 13 et 25 pendant 48 heures (voir figure 21). Cette augmentation est observée uniquement dans les RHE démasqués et non perméabilisés. Il serait donc intéressant de réaliser l'immunomarquage avec des RHE qui ont été fixés à froid, dans le but d'être plus proche de l'*in vivo*.

L'immunofluorescence réalisée sur les cultures de kératinocytes en monocouche ne révèle aucun signal. Cela peut être dû soit à une faible expression de l'ARNm d'IL-2R γ dans les kératinocytes cultivés en monocouche soit à la perméabilisation de ces cellules empêchant donc le marquage. De ce fait, le même marquage sans perméabilisation des kératinocytes doit être réalisé.

Conclusion et perspective

La désorganisation des microdomaines lipidiques ne régule pas la sous-unité IL-4R α que ce soit au niveau transcriptionnel, protéique ou au niveau de la signalisation de JAK1/STAT6. Par ailleurs, IL-4R α ne semble pas être situé dans les microdomaines lipidiques

Néanmoins une régulation de la sous-unité IL-13R α 1 semble être présente lors du traitement par la M β CD et par interleukines 4, 13 et 25, mais doit être confirmée au niveau protéique. En outre, IL-13R α 1 pourrait être localisé dans les microdomaines lipidiques. En effet, le même phénomène apparaît dans les lymphocytes T avec le récepteur d'IL-2. Seule la sous-unité IL-2R α se situe dans les microdomaines lipidiques et celle-ci migre hors des microdomaines pour dimériser avec IL-2R β et IL-2R γ (Rochman *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant d'analyser la localisation éventuelle d'IL-13R α 1 dans les microdomaines lipidiques.

Le récepteur IL-13R α 2 est régulé par la déplétion du cholestérol membranaire que ce soit au niveau transcriptionnel ou protéique. De plus l'expression de ce récepteur est régulée par la stimulation par les interleukines 4, 13 et 25 combinées. Néanmoins, l'expression protéique de ce récepteur semble être diminuée par la stimulation par l'IL-13. Il serait nécessaire dès lors d'étudier la signalisation activée par ce récepteur comme c'est le cas pour l'activation de TGF- β 1 dans les poumons et le colon (Fichtner-Feigl *et al.*, 2008). De plus, d'autres études ont démontré qu'IL-13R α 2 joue un rôle dans l'activation d'ERK, d'AKT et de la β -caténine par liaison de l'IL-13 mais également par liaison de la CHI3L1 (chitinase-3-like protein 1) (He *et al.*, 2013). La signalisation activée par ce récepteur peut être analysée par la diminution de l'activation de ces voies de signalisation par un *knock-out* du gène d'IL-13R α 2 et une stimulation par l'interleukine 13.

Par ailleurs, la localisation d'IL-13R α 2 au niveau des microdomaines lipidiques doit être analysée dans des études ultérieures dans le but de vérifier si ce récepteur est régulé directement par ces microdomaines.

La sous-unité du récepteur de type 1 aux interleukines 4, l'IL-2R γ , semble être surexprimée dans les kératinocytes lors d'une condition inflammatoire induite par la stimulation par les interleukines 4 et 13 ainsi que lors d'une perturbation des microdomaines lipidiques. En outre, la combinaison des deux traitements semble donner une réponse synergique. Cette observation doit être confirmée au niveau protéique. Si tel est le cas, l'interaction entre IL-4R α et IL-2R γ doit aussi faire l'objet d'une étude plus complète. En effet, IL-2R γ peut former des récepteurs fonctionnels avec d'autres sous-unités qu'IL-4R α (Rochman *et al.*, 2009). Par conséquent, il est nécessaire de vérifier que le récepteur de type 1 aux interleukines 4 est bien formé et fonctionnel dans les kératinocytes.

En outre pour établir si le récepteur est fonctionnel, la signalisation activée par le récepteur de type 1 serait intéressante à étudier, dans un premier temps dans des conditions inflammatoires et ensuite lors de la perturbation des microdomaines lipidiques. Plusieurs voies sont activées par ce récepteur telles que JAK1/STAT6, MAPK et PI3K (Haque *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2015). Dans ce mémoire, il a été montré que JAK1/STAT6 n'est pas activée lors de la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique des kératinocytes. Néanmoins, le traitement de ces kératinocytes par la M β CD peut réguler l'activation des deux autres voies. De ce fait, une analyse portant sur la phosphorylation de tyrosines précises d'IRS1/2 sera essentielle à réaliser par la suite puisque IRS1/2 est un intermédiaire de signalisation en amont des voies de signalisation de MAPK et de PI3K (Bhatt and Damania, 2012; Haque *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2015)

Par ailleurs, comme IL-4R α et IL-13R α 2 interagissent ensemble par la queue cytoplasmique d'IL-13R α 2 dans le but d'inhiber la voie de signalisation induite par l'IL-4 (Rahaman *et al.*, 2002), il serait intéressant d'étudier si le même phénomène se produit avec IL-2R γ .

REFERENCES

Références

Akaiwa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, *et al.* (2001) Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine* 13:75-84.

Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, *et al.* (2007) IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* 179:984-92.

Andrews AL, Holloway JW, Puddicombe SM, *et al.* (2002) Kinetic analysis of the interleukin-13 receptor complex. *J Biol Chem* 277:46073-8.

Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, *et al.* (2006) IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 118:858-65.

Andrews AL, Nordgren IK, Kirby I, *et al.* (2009) Cytoplasmic tail of IL-13Ralpha2 regulates IL-4 signal transduction. *Biochem Soc Trans* 37:873-6.

Auger FA, Berthod F, Moulin V, *et al.* (2004) Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol Appl Biochem* 39:263-75.

Bang B, Gniadecki R, Gajkowska B (2005) Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 14:266-72.

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, *et al.* (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 30:257-62.

Baum P, Fundel-Clemens K, Kreuz S, *et al.* (2010) Off-target analysis of control siRNA molecules reveals important differences in the cytokine profile and inflammation response of human fibroblasts. *Oligonucleotides* 20:17-26.

Beck LA, Thaci D, Hamilton JD, *et al.* (2014) Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N Engl J Med* 371:130-9.

Benson N, Snelder N, Ploeger B, *et al.* (2010) Estimation of binding rate constants using a simultaneous mixed-effects method: application to monoamine transporter reuptake inhibitor reboxetine. *Br J Pharmacol* 160:389-98.

Bhatt AP, Damania B (2012) AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV. *Front Immunol* 3:401.

Bieber T (2010) Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 22:125-37.

Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, *et al.* (2007) Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 178:3373-7.

Boguniewicz M, Leung DY (2011) Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 242:233-46.

Bourtembourg M (2016) La régulation des récepteurs des interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les keratinocytes épidermiques *Master thesis* 74.

Chen W, Sivaprasad U, Gibson AM, *et al.* (2013) IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 132:951-8 e1-6.

Chen W, Sivaprasad U, Tabata Y, *et al.* (2009) IL-13R alpha 2 membrane and soluble isoforms differ in humans and mice. *J Immunol* 183:7870-6.

Chen W, Tabata Y, Gibson AM, *et al.* (2008) Matrix metalloproteinase 8 contributes to solubilization of IL-13 receptor alpha2 in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 122:625-32.

Chu H (2012) development and structure of skin. In: *dermatology in general medicine* (57-72.

Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, *et al.* (2009) Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129:1892-908.

Daines MO, Hershey GK (2002) A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha-2 and their rapid mobilization by interferon-gamma. *J Biol Chem* 277:10387-93.

Daines MO, Tabata Y, Walker BA, *et al.* (2006) Level of expression of IL-13R alpha 2 impacts receptor distribution and IL-13 signaling. *J Immunol* 176:7495-501.

David M, Ford D, Bertoglio J, *et al.* (2001) Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene* 20:6660-8.

De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, *et al.* (2009) Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol* 129:14-30.

De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, *et al.* (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 127:773-86 e1-7.

de Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, *et al.* (2005) High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 125:1163-73.

De Vuyst E. (2016) Barrier alterations in a reconstructed human epidermis as a model for atopic dermatitis Docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques thesis, Unamur.

De Vuyst E, Giltair S, Lambert de Rouvroit C, *et al.* (2015) The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. *Arch Dermatol Res* 307:309-18.

De Vuyst E, Giltair S, Lambert de Rouvroit C, *et al.* (2016a) Methyl-beta-cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol*.

De Vuyst E, Mound A, Lambert de Rouvroit C, *et al.* (2016b) Modelling atopic dermatitis during the morphogenetic process involved in reconstruction of a human epidermis. *Curr Res Transl Med* 64:179-83.

De Vuyst E, Salmon M, Evrard C, *et al.* (2017) Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Frontiers in medicine* 4:1-12.

Deraison C, Bonnart C, Lopez F, *et al.* (2007) LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell* 18:3607-19.

do Nascimento Pedrosa T, De Vuyst E, Mound A, *et al.* (2017) Methyl-beta-cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model. *Arch Dermatol Res* 309:63-9.

Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, *et al.* (1998) The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 161:2317-24.

Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, *et al.* (2013) Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 1833:3471-80.

Elias PM, Steinhoff M (2008) "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 128:1067-70.

Elmose C, Thomsen SF (2015) Twin Studies of Atopic Dermatitis: Interpretations and Applications in the Filaggrin Era. *J Allergy (Cairo)* 2015:902359.

Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, *et al.* (2008) IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 135:2003-13, 13 e1-7.

Fore J (2006) A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage* 52:24-35; quiz 6-7.

Frankart A, Coquette A, Schroeder KR, *et al.* (2012a) Studies of cell signaling in a reconstructed human epidermis exposed to sensitizers: IL-8 synthesis and release depend on EGFR activation. *Arch Dermatol Res* 304:289-303.

Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, *et al.* (2012b) Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol* 21:871-5.

Gandhi H, Worch R, Kurgonaite K, *et al.* (2014) Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells. *Biophys J* 107:2515-27.

Georgantzopoulou A, Serchi T, Cambier S, *et al.* (2016) Effects of silver nanoparticles and ions on a co-culture model for the gastrointestinal epithelium. *Part Fibre Toxicol* 13:9.

Giltaire S, Lambert S, Poumay Y (2011) HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. *J Cell Physiol* 226:1651-9.

Gniadecki R, Bang B (2003) Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J Invest Dermatol* 121:522-8.

Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, *et al.* (2017) Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis* 8:e3045.

Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M, *et al.* (1998) Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 273:33893-6.

Hata TR, Kotol P, Jackson M, *et al.* (2008) Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 122:829-31.

Hayward CP, Liang M, Tasneem S, *et al.* (2017) The duplication mutation of Quebec platelet disorder dysregulates PLA2, but not C10orf55, selectively increasing production of normal PLA2 transcripts by megakaryocytes but not granulocytes. *PLoS One* 12:e0173991.

He CH, Lee CG, Dela Cruz CS, *et al.* (2013) Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor $\alpha 2$. *Cell Rep* 4:830-41.

Huang XL, Wang YJ, Yan JW, *et al.* (2015) Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. *Inflamm Res* 64:151-9.

Hussein YM, Ahmad AS, Ibrahim MM, *et al.* (2011) Interleukin 13 receptors as biochemical markers in atopic patients. *J Invest Allergol Clin Immunol* 21:101-7.

Hussein YM, Shalaby SM, Nassar A, *et al.* (2014) Association between genes encoding components of the IL-4/IL-4 receptor pathway and dermatitis in children. *Gene* 545:276-81.

Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (1998) Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol* 7:1-10.

Jans R, Atanasova G, Jadot M, *et al.* (2004) Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* 123:564-73.

Jensen JM, Pfeiffer S, Witt M, *et al.* (2009) Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 124:R19-28.

Jin H, He R, Oyoshi M, *et al.* (2009) Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129:31-40.

Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, *et al.* (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30:954-63.

Kamsteeg M, Bergers M, de Boer R, *et al.* (2011) Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. *Am J Pathol* 178:2091-9.

Kamsteeg M, Zeeuwen PL, de Jongh GJ, *et al.* (2007) Increased expression of carbonic anhydrase II (CA II) in lesional skin of atopic dermatitis: regulation by Th2 cytokines. *J Invest Dermatol* 127:1786-9.

Kawakami K, Taguchi J, Murata T, *et al.* (2001) The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 97:2673-9.

Kazi JU, Kabir NN, Flores-Morales A, *et al.* (2014) SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 71:3297-310.

Khoo SK, Zhang G, Backer V, *et al.* (2006) Associations of a novel IL4RA polymorphism, Ala57Thr, in Greenland Inuit. *J Allergy Clin Immunol* 118:627-34.

Kim YH, Ninomiya Y, Yamashita S, *et al.* (2014) IL-4 receptor alpha in non-lipid rafts is the target molecule of strictinin in inhibiting STAT6 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 450:824-30.

Kioi M, Kawakami K, Puri RK (2004) Mechanism of action of interleukin-13 antagonist (IL-13E13K) in cells expressing various types of IL-4R. *Cell Immunol* 229:41-51.

Koch PJ, Roop DR (2004) The role of keratins in epidermal development and homeostasis--going beyond the obvious. *J Invest Dermatol* 123:x-xi.

Kolarsick AJ, Kolarsick MA, Goodwin C (2011) Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 3:203-13.

Kurgonaite K, Gandhi H, Kurth T, *et al.* (2015) Essential role of endocytosis for interleukin-4-receptor-mediated JAK/STAT signalling. *J Cell Sci* 128:3781-95.

Lambert S, Ameels H, Gniadecki R, *et al.* (2008) Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation. *J Cell Physiol* 217:834-45.

Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S, *et al.* (2006) Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol* 126:954-62.

LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, *et al.* (2008) Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 132:259-72.

Larsen L, Ropke C (2002) Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 110:833-44.

Leung DY (2013) New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int* 62:151-61.

Liang Y, Chang C, Lu Q (2016) The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 51:315-28.

Liao W, Lin JX, Leonard WJ (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 38:13-25.

Lopez CA, de Vries AH, Marrink SJ (2013) Computational microscopy of cyclodextrin mediated cholesterol extraction from lipid model membranes. *Sci Rep* 3:2071.

Lu ZR, Park D, Lee KA, *et al.* (2009) Profiling the dysregulated genes of keratinocytes in atopic dermatitis patients: cDNA microarray and interactomic analyses. *J Dermatol Sci* 54:126-9.

Marmor MD, Julius M (2001) Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98:1489-97.

Mathay C, Giltaire S, Minner F, *et al.* (2008) Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 128:717-27.

Mathay C, Pierre M, Pittelkow MR, *et al.* (2011) Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol* 131:46-58.

Mathay C, Poumay Y (2010) Lipid rafts and the oxidative stress hypothesis. *J Invest Dermatol* 130:1457-9.

Miloux B, Laurent P, Bonnin O, *et al.* (1997) Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Lett* 401:163-6.

Milstone LM (2004) Epidermal desquamation. *J Dermatol Sci* 36:131-40.

Mound A, Lozanova V, Warnon C, *et al.* (2017) Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochim Biophys Acta* 1862:958-71.

Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, *et al.* (2002) Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta* 1592:237-50.

Murata T, Obiri NI, Puri RK (1998) Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors (review). *Int J Mol Med* 1:551-7.

Nabi IR, Le PU (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161:673-7.

Nicolson GL (2014) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* 1838:1451-66.

O'Toole M, Legault H, Ramsey R, *et al.* (2008) A novel and sensitive ELISA reveals that the soluble form of IL-13R-alpha2 is not expressed in plasma of healthy or asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 38:594-601.

Oh HY, Lee EJ, Yoon S, *et al.* (2007) Cholesterol level of lipid raft microdomains regulates apoptotic cell death in prostate cancer cells through EGFR-mediated Akt and ERK signal transduction. *Prostate* 67:1061-9.

Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, *et al.* (2009) Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol* 129:1412-20.

Omori-Miyake M, Yamashita M, Tsunemi Y, *et al.* (2014) In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans. *J Invest Dermatol* 134:1342-50.

Pasparakis M, Haase I, Nestle FO (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14:289-301.

Pike LJ (2005) Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* 1746:260-73.

Poumay Y, Coquette A (2007) Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res* 298:361-9.

Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, *et al.* (2004) A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res* 296:203-11.

Rahaman SO, Sharma P, Harbor PC, *et al.* (2002) IL-13R(alpha)2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Res* 62:1103-9.

Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118:1099-102.

Raschke S, Guan J, Iliakis G (2009) Application of alkaline sucrose gradient centrifugation in the analysis of DNA replication after DNA damage. *Methods Mol Biol* 521:329-42.

Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ (2009) New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9:480-90.

Samuelov L, Sarig O, Harmon RM, *et al.* (2013) Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nat Genet* 45:1244-8.

Schindler C, Levy DE, Decker T (2007) JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 282:20059-63.

Schmidt R, Parish EJ, Dionisius V, *et al.* (1991) Modulation of cellular cholesterol and its effect on cornified envelope formation in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 97:771-5.

Shaw AS (2006) Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol* 7:1139-42.

Sidbury R, Sullivan AF, Thadhani RI, *et al.* (2008) Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. *Br J Dermatol* 159:245-7.

Simon D, Bieber T (2014) Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy* 69:46-55.

Simons K, Ehehalt R (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110:597-603.

Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-72.

Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004697.

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-9.

Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-31.

Tabata Y, Khurana Hershey GK (2007) IL-13 receptor isoforms: breaking through the complexity. *Curr Allergy Asthma Rep* 7:338-45.

Ul-Haq Z, Naz S, Mesaik MA (2016) Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine Growth Factor Rev* 32:3-15.

Wadsworth SJ, Atsuta R, McIntyre JO, *et al.* (2010) IL-13 and TH2 cytokine exposure triggers matrix metalloproteinase 7-mediated Fas ligand cleavage from bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 126:366-74, 74 e1-8.

Waickman AT, Park JY, Park JH (2016) The common gamma-chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell Mol Life Sci* 73:253-69.

Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, *et al.* (2003) Up-regulation of interleukin-13 receptor alpha1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 33:31-40.

Zhu J (2015) T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* 75:14-24.